

Andressa Temperine de Oliveira Marre

Aderência de bactérias do gênero *Prevotella* a
componentes da matriz extracelular humana



Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do (a) Professor (a) Leandro Araujo Lobo e coorientação de Renata Boente Ferreira.

CIP - Catalogação na Publicação

T282a Temperine de Oliveira Marre, Andressa
Aderência de bactérias do gênero *Prevotella* a
matriz extracelular humana / Andressa Temperine de
Oliveira Marre. -- Rio de Janeiro, 2017.
117 f.

Orientador: Leandro Araujo Lobo.
Coorientadora: Renata Ferreira Boente.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Adesão . 2. *Prevotella*. 3. Laminina. I.
Araujo Lobo, Leandro , orient. II. Ferreira Boente,
Renata, coorient. III. Título.

Aos meus amados bisavós, Alayde, Pedro e
Maria

AGRADECIMENTOS

Após 4 longos anos, o momento mais esperado da graduação finalmente chegou e eu só tenho a agradecer a todos que me apoiaram e me ajudaram nesse caminho. Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Ana e Fábio, que me apoiaram durante todo esse tempo, aturaram todos os dramas (que foram muitos) e aceitaram encarar minha escolha de ser uma professora e cientista.

Aos meus avós, Elenice, Oliveira, Fátima e Edson, por todo o amor incontável durante esses anos. Também ao meu tiozão do coração, Dudu, que soube me zoar demais, mas que também me acordou com ótimos abraços depois de noites longas de estudo. E claro que não vou esquecer do meu tio postiço Orelhinha, que nunca esqueceu de me chamar de nerd. A minha tia Camila, também por todo o apoio e carinho. E a toda a minha família que é gigante e que eu amo demais (Tia Ninha, Tio Márcio, Pedro, Duda, Tio Junior, Rosie, Isabelle, Matheus, Gabriel, Lelê, Gleice, Rubinho, Cacá, Ceci, Tia Graça, Tio Ramos). Agradeço também ao meu padrinho Fabio, que sempre foi um grande exemplo na minha vida e ao Sergio que sempre me motivou e me apoiou.

Agradeço as minhas maravilhosas amigas Ana Paula, Juliana e Victória (não, a ordem não é de preferência), por todas as frases de “você é louca Andressa”, “Andressa, que curso é esse?” ou a clássica “você não sabe por o que ela passou”. Vocês me seguem desde o ensino médio e viram meu amor absurdo pela UFRJ e a minha felicidade em passar, viram todos os meus dramas e as vontades loucas de largar tudo. Eu amo demais as três (igualmente) e sei que daqui há 10 anos Ana e Jubs irão se formar.

Aos meus amigos de faculdade que foram maravilhosos para mim. A Gio, minha companheira/irmã (como todos do lab dizem), você me ajudou de tantas formas, em tantas coisas que eu nem tenho palavras pra te agradecer por todos os momentos, lágrimas, abraços e conversas (falando mal dos outros), você é maravilhosa e vai ser a maioral das indústrias um dia. Isa, você é a pessoa mais iluminada e especial do mundo, obrigada por tudo. Fernanda, fedida e peluda, a gente briga, mas tu sabe que eu te amo demais, sua coisa fofa de Inhaúma. Renatinho, você é o cara mais cara do mundo, você é incrível, tem uma mente brilhante e sabe como ninguém como ter discussões que são levadas direto pro Google. Vinnie, você é o melhor em me fazer sorrir, obrigada por

todos os momentos e todas as cervejas compartilhadas, isso também serve pro Lucas que me bancou em inúmeras chopadas. Sid, você é o melhor pai de todos. Scar, minha veterana mais fofa e linda, obrigada por tudo!!!! Luiza, você também é a veterana mais fofa e linda hahahaha. Karinne volta a comer carne logo pra que eu não fique mega preocupada com a sua saúde e obrigada pelos momentos de risada no lab, em foz e nos caminhos longos pra casa. Carneiro (pão doce mais lindo desse mundo) e Xuliana, vocês estão no meu coração e são as coisas mais gostosas e fofas desse mundo, obrigada por tudo, toda a ajuda, todas as conversas, as brincadeiras e as viagens até nikiti (próximo congresso a gente divide quarto e expulsa Camilla), ah Ju, o agradecimento pra você é em especial, obrigada demais por todas as vezes que você me ajudou, inoculando uma bactéria, lendo um experimento, indo comigo pro lab nos sábados e domingos, você é incrível e maravilhosa demais, eu nem sei como te agradecer por tudo, te adoro demais. E por último, Matheus, obrigada por me encher o saco, por gostar tanto de imuno e por manter minha saúde mental todo esse tempo de escrita.

Ao Leandro, por aceitar a empreitada de ser meu orientador (que não deve ser fácil). Antes de entrar no laboratório, uma pessoa me disse que você era um professor muito maluco, e a única coisa que eu pensei era que se você era louco, eu era mais ainda, então essa relação tinha que dar certo, e deu, você é o melhor orientador que eu poderia pedir. Obrigada pelos conselhos, por não desistir de mim e por me ajudar muito mesmo. A Renatinha, a melhor coorientadora do mundo, que aguentou meus choros na madrugada, meus dramas e desesperos e encarou com tranquilidade (até demais), obrigada de verdade por tudo, você é incrível e é uma cientista maravilhosa. A Regina, sempre maravilhosa, com um coração gigante e que sempre tem uma palavra para nos ajudar e nos socorrer.

Aos anaeróbios que fizeram esse projeto acontecer e me ajudaram demais. Camilla, obrigada por todos os conselhos e por sempre tentar encontrar uma parte racional dentro do meu desespero. Kelly, rainha do lab, você é maravilhosa! May, muito obrigada por tudo e vamos que vamos, porque aderência é o poder!! Lili, a minha companheira de Gin tônica e que sempre tem um protocolo esperto no caderno. Ao Joaquim (quindão), que sempre me ajudou no que pode e nunca deixou de me zuar. Ao Felipe e a Heidi que sempre estiveram dispostos a tirar dúvidas e me ajudar com algo. Um obrigado também a Clara, Carlinha (você é a mulher maravilha), Karlinha (Te adoro!!), Edu (que me ajudou desde o início no lab com tudo), Drika (que sabe como é

ser aluna do lele), Kelvin (é sua culpa), Thiago, Maria Fernanda, Marcela, Mariana Masello (vai dar tudo certo com o Enem!), Mariana Oliveira, Priscylla, Carol (que daqui a pouco vai se soltar e ser igual a camilla), Ju reviello (obrigada pelas caronas), Mellissa, Laura (a menina internacional mais linda e estilosa), Julianna, Isa (a caloura fofa e que todos amamos), Semiramis e a todos que me ajudaram de alguma formas nesses anos, muito obrigada!

Ao André, que consegue sempre me salvar de todos os problemas na graduação, a Dilma que sempre me deixava pegar livros, por mais que eu atrasasse algum, a todos os professores, e em especial a Thaís Cristina Baeta Soares Souto Padrón, que me deu a primeira aula da graduação, sempre foi uma inspiração e uma professora maravilhosa que faz uma imensa falta. E aos funcionários que ajudam em todo o funcionamento do instituto.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, a diretora Alane Beatriz Vermelho e da coordenadora de graduação Lúgia Maria Torres Peçanha.

Às instituições de apoio à pesquisa: CNPq, PIBIC, FAPERJ e CAPES.

Resumo

Andressa Temperine de Oliveira Marre**Aderência de bactérias do gênero *Prevotella* a moléculas da matriz extracelular humana****Orientador: Leandro Araujo Lobo****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Prevotella é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia, que está associada com infecções oportunistas na cavidade oral, vaginal e trato gastrointestinal. A adesão a tecidos do hospedeiro é considerada um passo fundamental para o início de um processo infeccioso e persistência. *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens* requerem uma capacidade de adesão para iniciar a colonização na região sulco gengival e induzir um quadro de periodontite. Esse estudo teve como objetivo avaliar a interação entre *Prevotella* spp. e componentes da MEC, e também identificar os ligantes bacterianos responsáveis por essa adesão. Inicialmente, laminina foi imobilizada em lamínulas de vidro e desafiadas com diferentes concentrações de bactérias. Os resultados preliminares demonstraram a adesão de forma dose dependente de *P. nigrescens* e *P. melaninogenica*. O resultado mostra uma média de bactérias aderidas em 10 campos de 0,049 mm² escolhidos aleatoriamente e contados com o programa *Image J*. Para *P. melaninogenica*, de 599,5 Bac/CV na concentração de 5.10⁷ CFU/mL, 141 Bac/CV na concentração de 10⁷ CFU/mL e a adesão no controle negativo (BSA) foi de 38 Bac/CV na concentração de 10⁸ CFU/mL. Em *P. nigrescens*, a média obtida foi de 316,6 Bac/CV na concentração de 5.10⁷ CFU/mL, 155,4 Bac/CV na concentração de 10⁷ CFU/mL, e a adesão ao controle negativo (BSA) foi de 98,1 Bac/CV na concentração de 10⁸ CFU/mL. Testes com *P. intermedia* não demonstraram adesão a laminina. Para identificação dos ligantes, foi realizada uma extração de proteínas de membrana externa (PMEs) que foi visualizada por eletroforese e técnicas de coloração sensíveis. Essas proteínas foram submetidas a uma coluna de afinidade por cromatografia que consiste em laminina imobilizada em Sefarose NHS-ativada. As proteínas eluídas da coluna foram submetidas a análise por SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata e azul de coomassie coloidal. As bandas e as amostras eluídas passaram por um processo de digestão com tripsina e enviadas para análise de espectrometria de massas. Os resultados indicam que as espécies de *P. nigrescens* e *P. melaninogenica* são capazes de se aderir a laminina, e *P. nigrescens* possui uma proteína com função de adesina. O estudo nos permitirá entender os mecanismos envolvidos no processo de adesão bacteriana a tecidos do hospedeiro e ajudar a estabelecer novas estratégias para prevenir essa colonização.

Palavras-chave: Laminina, Adesão, *Prevotella*, Matriz Extracelular

ABSTRACT

Andressa Temperine de Oliveira Marre

Recognition of extracellular matrix by pathogenic oral *Prevotella* spp

Orientador: Leandro Araujo Lobo

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Prevotella is a Gram-negative anaerobic bacteria associated with opportunist infections in oral, vaginal and gastrointestinal tract. Host tissue adhesion is considered the fundamental step to an infectious process and persistence. *P. intermedia*, *P. melaninogenica* and *P. nigrescens* require a strong adhesion capacity in the gingival sulcus to initiate colonization and induce an oral disease. This study aims to evaluate the interaction between *Prevotella* spp. with ECM components and identify the bacterial ligands responsible for this adherence. Initially, we immobilized laminin on glass slides and challenged with different concentrations of bacteria. Binding of *P. nigrescens* increased with inoculum concentration on a dose-dependent manner. An average of 317.4 bacterial per microscope field of view was observed with an inoculum concentration of 10^8 CFU/ml whereas, 316.6 for 5×10^7 CFU/ml and 155.4 for 10^7 CFU/ml. Adhesion to the negative control (BSA) at a concentration of 10^8 CFU/ml was 98.1. Similar results were observed in *P. melaninogenica*. Tests with *P. intermedia* showed lesser adhesion to laminin. For identification of bacterial ligands, extraction of outer membrane proteins (OMPs) was performed. Enriched OMP fractions were visualized by SDS-PAGE and different patterns of OMP were observed among the strains analyzed. These proteins were subjected to an affinity chromatography column consisting of laminin immobilized on NHS-activated Sepharose. The proteins eluted from the column were subjected to SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The eluted samples were digested with trypsin and sent to mass spectrometry analysis. Our results indicate that *P. nigrescens* and *P. melaninogenica* strains are capable of adhesion to laminin and *P. nigrescens* has a protein, wich has an adhesion function. Our study will allow us to understand the mechanisms involved in bacterial adhesion to host tissues and may help the development of new strategies to prevent this colonization.

Keywords: Laminin, Adhesion, Proteins

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Membrana Basal	5
Figura 2: Interações entre a molécula de laminina e seus receptores	7
Figura 3: Destruição do epitélio e ligação a moléculas da MEC.	18
Figura 4: Esquema do experimento em Microplaca.....	34
Figura 5: Adesão de <i>P. nigrescens</i> a laminina.....	44
Figura 6: Adesão de <i>P. melaninogenica</i> a laminina.....	45
Figura 7: Quantificação de <i>P. nigrescens</i> aderidas por campo visual.....	46
Figura 8: Quantificação de <i>P. melaninogenica</i> aderidas por campo visual.	47
Figura 9:Extração de PMEs de <i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> e <i>P. nigrescens</i>	48
Figura 10: Extração de PMEs de <i>P. nigrescens</i> utilizando diferentes HEPES.	48
Figura 11: Purificação do ligante de <i>P. nigrescens</i> após concentração.....	50
Figura 12: Extração de PMEs de <i>P. intermedia</i> utilizando quantidades maiores de meio de cultura e purificação do ligante	51
Tabela 1: Origem das cepas utilizadas	35
Tabela 2: Proteínas ligantes a laminina de <i>P. nigrescens</i> identificadas a partir das bandas cortadas do gel contendo eluição com glicina-HCl.....	53
Tabela 3: Proteínas ligantes a laminina de <i>P. nigrescens</i> identificadas a partir da digestão in solution da eluição com glicina-HCl.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrometro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ANOVA	Análise de variância
APS	Do inglês: <i>Ammonium persulfate</i>
ASS	Agar Sangue Suplementado
ATCC	Do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>
BAM	Do inglês: <i>β-barrel assembly machinery</i>
BHI	Do inglês: <i>Brain Heart Infusion</i>
BmpA	Do inglês: <i>Basic membrane protein A</i>
BSA	Do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CMRVS	Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária
DA	Do inglês: <i>Dalton</i>
DDA	Do inglês: <i>Automated Data Dependent Acquisition</i>
DegP	Do inglês: <i>Periplasmic serine endoprotease</i>
DNA	Do inglês: <i>Deoxiribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EGF	Do inglês: <i>Epidermal growth factor</i>
EHEC	Do inglês: <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC	Do inglês: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ESI-Q-TOF	Do inglês: <i>Electrospray Ionization Quadrupole Time-Flight Mass Spectrometry</i>
FGF	Do inglês: <i>Fibroblast growth factors</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 hidroximetil piperazina-1
HPLC	Do inglês: <i>High performance liquid chromatography</i>
HS	Do inglês: <i>High Performance</i>

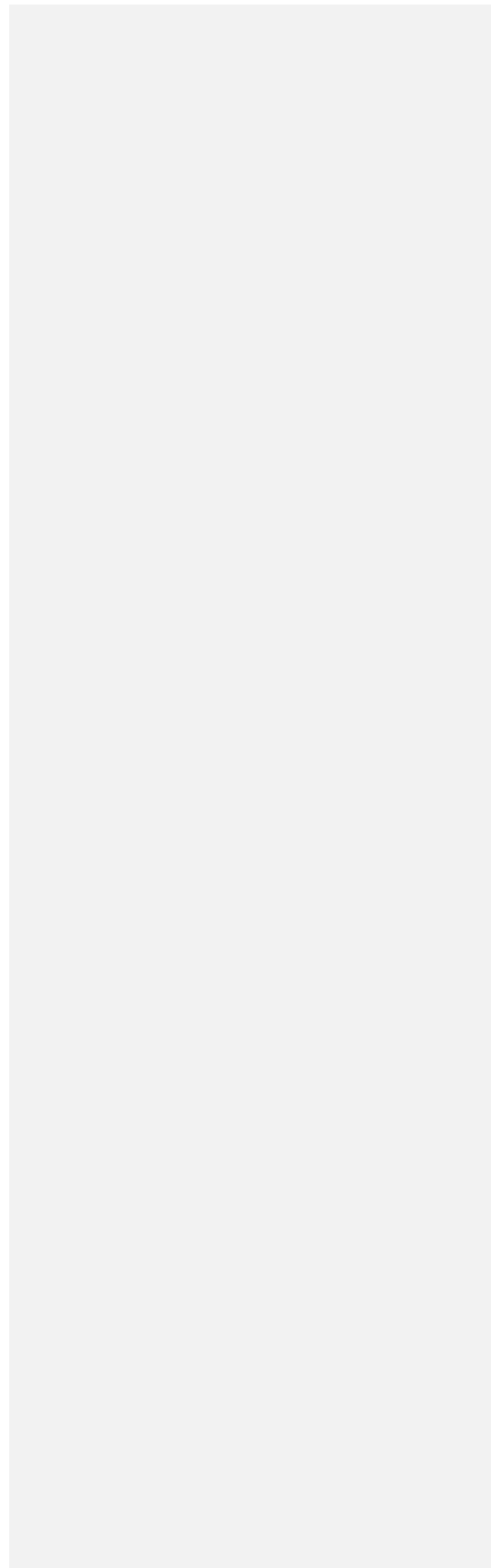
IAA	IodoAcetamida
IGF	Do inglês: <i>Insulin Growth Factor</i>
INCQS	Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde
INF- γ	Interferon gama
INOS	Do inglês: <i>Nitric oxide synthases</i>
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
kg	Quilogramas
L4	Do inglês: <i>Laminin domain 4</i>
LC-MS	Do inglês: <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LE	Do inglês: <i>Laminin-type epidermal growth factor-like domain</i>
LF	Do inglês: <i>Laminin globular domain four</i>
LG	Do inglês: <i>Laminin globular domain</i>
LN	Do inglês: <i>Laminin N-terminal domain</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MEC	Matriz Extracelular
mM	Milimolar
MS	Do inglês: <i>Mass Spectrometry</i>
MSCRAMM	Do inglês: <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NHS	NHS
NO	Do inglês: <i>Nitric oxide</i>
Omp	Do inglês: <i>Outer Membrane Protein</i>
PA	Pró Análise
PAGE	Do inglês: <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Do inglês: <i>Phosphate Buffered Salin</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
PDGF	Do inglês: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PME	Proteína de Membrana Externa
PRAS	Do inglês: <i>pre-reduced anaerobically sterilized</i>
rpm	Rotações por minuto
SDS	Do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Skp	Do inglês: <i>Seventeen Kilodalton Protein</i>

SurA	Do inglês: <i>Survival protein A</i>
TEMED	Tetrametil-etilenadiazina
TGF β	Do inglês: <i>Transforming growth factor beta</i>
TRIS	Hidroximetil-aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
UHPLC	Do inglês: <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Componentes da Matriz Extracelular	1
1.1.1	Membrana Basal.....	4
1.1.2	Laminina	9
1.2	Adesão bacteriana	11
1.2.1	Adesão mediada por proteínas de membrana externa (PMEs).....	14
1.2.2	Adesão a proteínas da matriz extracelular.....	15
1.2.3	Adesão de bactérias anaeróbias	18
1.3	Gênero <i>Prevotella</i>	22
2.	Justificativa	30
3.	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivos gerais.....	31
3.2	Etapas do estudo.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	32
4.2	Quantificação da Adesão de <i>Prevotella</i>	33
4.3	Obtenção de extrato enriquecido de PMEs	35
4.4	Purificação do ligante específico através de coluna de cromatografia por afinidade.....	36
4.5	Concentração dos extratos proteicos	37
4.6	Extração e digestão de proteínas separadas por SDS-PAGE	38
4.7	Análise eletroforética	37
4.8	Coloração de Proteínas	37
4.9	Digestão de proteínas <i>in solution</i>	40
4.10	Identificação das proteínas por espectrometria de massas	40
4.11	Bioinformática.....	42
5.	RESULTADOS.....	43
5.1	Quantificação da adesão de cepas de <i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> e <i>P. nigrescens</i>	43
5.2	Obtenção de extrato enriquecido de PMEs e análise eletroforética	47
5.3	Purificação do ligante específico através de cromatografia de afinidade e análise eletroforética	49
5.4	Proteômica.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÃO	65

8. REFERÊNCIAS 66



1. INTRODUÇÃO

1.1 Componentes da Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um complexo de macromoléculas que formam uma estrutura específica que varia de tecido para tecido e que pode ser encontrada em organismos multicelulares. Avanços no sequenciamento do genoma humano tem permitido rastrear a evolução da MEC, e estudos recentes revelaram que alguns domínios proteicos, e proteínas com características semelhantes as da MEC humana existem em organismos unicelulares (Hynes, 2012). Ainda, a elaboração de proteínas e a própria matriz é amplamente encontrada nas espécies do reino *Metazoa* (Keeley e Mecham 2013).

Sua estrutura e organização complexa são fundamentais para diversos processos biológicos, tais como: crescimento, migração, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e homeostase das células eucarióticas (Frantz, Stewart e Weaver, 2010). Cada tecido possui uma constituição de MEC específica, com isso as macromoléculas que constituem a MEC desenvolveram propriedades estruturais e químicas que são particularmente adequadas às funções biológicas nos respectivos tecidos. Essas macromoléculas possuem domínios de ligação para fatores de crescimento e quimiocinas, estabelecem um complexo para adesão e formam barreiras de difusão entre diferentes camadas celulares (Mouw, Ou e Weaver, 2014). Assim, moléculas da MEC funcionam como suporte para as células e são participantes ativos na sinalização para controlar o comportamento celular. Todos os tipos de células dos tecidos epiteliais (ex: fibroblastos, células imunes, células endoteliais) sintetizam e secretam macromoléculas da MEC sobre o controle de múltiplos sinais (Theocharis *et al.*, 2015).

Dois classes principais de macromoléculas formam a MEC: (i) proteínas fibrosas, incluindo colágenos e elastinas, e (ii) glicoproteínas, incluindo fibronectina e laminina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas (GAGs), as quais são altamente ácidas e formam uma substância hidratada, onde as proteínas fibrosas estão embebidas. Os maiores constituintes da MEC nos tecidos fibrosos e cartilagosos são o colágeno tipo I e II, respectivamente (Aumailley e Gayraud, 1998). Esses tipos de colágeno se

associam a outros tipos de colágenos, proteínas da MEC e proteoglicanas para construir grandes estruturas fibrilares (Theocharis *et al.*, 2015). Essas estruturas moleculares estão interconectadas com as moléculas da MEC, se associam entre si e constituem uma rede tridimensional complexa da matriz (Theocharis *et al.*, 2012).

As proteínas fibrosas, dentre elas o colágeno e a elastina, são responsáveis pela organização da matriz através da ligação da mesma a células que nela estão embebidas. Colágenos são as principais proteínas da MEC e as mais predominantes. Durante décadas de pesquisa foram descobertos 28 diferentes tipos de colágeno e cada tipo é composto de homotrímeros ou heterotrímeros (Deshmukh *et al.*, 2016). Suas principais funções são fornecer resistência a tecidos, suporte, ligação entre células e moléculas da matriz e fortalecer a junção entre epitélio e tecido (Deshmukh *et al.*, 2016). As fibras formadas pela proteína elastina são grandes estruturas da MEC, que fornecem retração aos tecidos que sofrem alongamento, tais como, vasos sanguíneos, pulmões, coração, ligamentos, entre outros (Theocharis *et al.*, 2012).

As proteoglicanas estão localizadas em torno das células e são encontradas em abundância na cartilagem e na MEC neural. São proteínas glicosiladas com cadeias de GAGs. A função primária das proteoglicanas deriva das características bioquímicas e hidrodinâmicas das moléculas de GAGs, que se ligam a água para proporcionar hidratação e resistência à compressão (Mouw, Ou e Weaver, 2014). São caracterizados por terem uma proteína central que está covalentemente ligada a GAGs e podem ser classificados em subtipos com base na estrutura das cadeias de GAGs e na densidade dessas cadeias ao longo da proteína central (Cui *et al.*, 2013; Schwartz e Domowicz, 2004). As estruturas, e consequentemente, as funções das proteoglicanas na MEC dependem da expressão de proteínas nucleares através do retículo endoplasmático e da montagem de cadeias de GAGs ligadas a proteína central mediada pelo Golgi. As proteoglicanas podem ser classificadas em quatro classes: proteoglicanas intracelulares, proteoglicanas de superfície celular, proteoglicanas da membrana basal-pericelular e proteoglicanas extracelulares (Iozzo e Schaefer, 2015).

As proteoglicanas da superfície celular possuem duas subfamílias principais, sidecanas e glicopicanas. Elas se encontram na superfície da célula e carregam principalmente cadeias de sulfato de heparana (HS). Proteoglicanas da membrana basal-pericelular possuem cadeias HS e estão intimamente associadas a células através de

receptores ancorados na membrana, como integrinas. Essas proteoglicanas fazem parte da membrana basal. Os membros dessa classe são as perlecanas, agrinas e colágeno tipo XV e XVIII (Theocharis *et al.*, 2015).

As proteoglicanas extracelulares são subdivididas em hilectanas, que constituem os componentes principais da cartilagem, vasos sanguíneos e sistema nervoso central (Mouw, Ou e Weaver, 2014). Essa subclasse de proteoglicana se liga ao ácido hialurônico (AH) formando complexos supramoleculares de alta viscosidade. Dentro das hilectanas, se encontram agrecanas, versicanas, neurocanas e brevicanas que possuem características estruturais em comum. A segunda subclasse são as pequenas proteoglicanas ricas em leucinas que possuem diversas funções biológicas como, interagir com diversos colágenos, regular a fibrilogênese de colágeno e modular vias de sinalização celular através da ligação a receptores de tirosina cinase e receptores de imunidade inata. Essa classe de proteoglicanas também pode ser encontrada na circulação e em fluidos corporais (Chen e Birk, 2013; Theocharis *et al.*, 2015; Iozzo e Schaefer, 2015). As pequenas proteoglicanas ricas em leucinas são divididas em classes; da classe I a III são chamadas de canônicas e a classe IV e V são não-canônicas e não possuem cadeias de GAGs, mas compartilham homologia estrutural e várias propriedades funcionais com as proteoglicanas da classe de pequenas leucinas. A classe I consiste em decorina, biglicana e asporina, a classe II contém fibromodulina, queratocano e osteoadarina, a classe III contém opiticina, osteoglicina, entre diversas outras proteoglicanas (Theocharis *et al.*, 2015). A última subclasse é da família de genes Testecanas/SPOCK (Sethi e Zaia, 2017). SPOCK possui uma estrutura similar a perlecanas e agrinas, com cinco domínios. Estudos mostraram que SPOCKs estão envolvidos na regulação neuronal (Schnepp *et al.*, 2005.; Dhamija *et al.*, 2014).

As GAGs são heteropolissacarídeos carregados negativamente, que contém dissacarídeos repetidos, compostos principalmente de dois açúcares modificados, N-acetil-D-galactosamina ou N-acetil-D-glucosamina e um ácido urônico (ácido D-glucurônico ou ácido L-idurônico) (Theocharis *et al.*, 2015). Os principais tipos de glicosaminoglicanos incluem: ácido hialurônico (HA), sulfato de heparana (HS), sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatana (DS) e sulfato de keratana (KS) (Cui *et al.*, 2013; Zhang, 2010; Deepa *et al.*, 2006; Simon e Parish, 2013; Sethi e Zaia, 2017). Em geral, cada cadeia de GAGs é um mosaico de dissacarídeos de número e estrutura variável. Elas desempenham papéis essenciais em todas as áreas da fisiologia, através de

suas propriedades biofísicas e capacidade de ligação a fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento (Sethi e Zaia, 2017).

1.1.1 Membrana Basal

Um tipo especializado de MEC é a membrana basal ou lâmina basal, sendo uma camada muito fina, de 50 a 125 nanômetros, formada por um complexo proteico, localizada no lado basal de cada epitélio (Pozzi, Yurchenco e Iozzo, 2016) (Figura 1). A lâmina basal separa as monocamadas de tecido conjuntivo subjacente, fornece suporte estrutural às células, e influencia e modifica o comportamento celular através de sinalização externa (Lebleu, MacDonald e Kalluri, 2007). Essa estrutura funciona como uma extensão da membrana plasmática e protege os tecidos de tensões bioquímicas, biofísicas e medeia a comunicação entre célula e tecido, e entre células e ambiente externo (Yurchenco, 2011). A arquitetura de cada membrana basal é única e difere de tecido para tecido, sendo tão diversa quanto suas funções biológicas, proporcionam suporte estrutural e organiza as monocamadas celulares durante o desenvolvimento de tecidos (Lebleu, MacDonald e Kalluri, 2007).

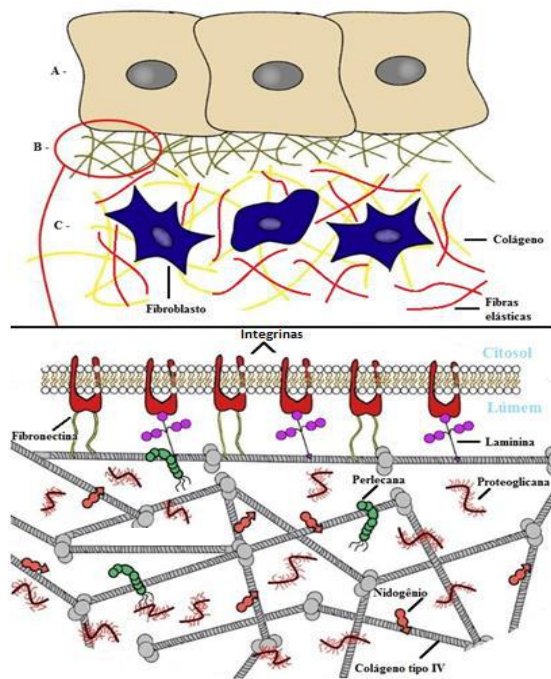


Figura 1: Membrana Basal. A – epitélio de revestimento; B- membrana basal, com aumento demonstrando como se organiza essa rede de sustentação da célula, com os principais componentes, laminina, fibronectina, perlecanas, nidogênio, proteoglicanas e colágeno tipo IV; C- Tecido conjuntivo.

Através da microscopia eletrônica de cortes teciduais finos impregnados com metais pesados e fixadas com glutaraldeído, a membrana basal é tipicamente vista como uma camada densa de elétrons (lâmina densa), sendo separada da membrana plasmática por uma camada translúcida (lâmina lúcida) (Yurchenco, 2011). A lâmina densa é geralmente uniforme, sua espessura varia de 15 a 125 nanômetros, de acordo com o tecido e as espécies. É considerada a parte mais importante uma vez que a ausência da lâmina densa pode ser considerada como a ausência da membrana basal. A lâmina lúcida é a parte mais exterior da membrana basal, se situando próximo a membrana plasmática das células. É uma camada muito fina, variando de 15 a 65 nanômetros e atravessada por apêndices filamentosos (Inoue, 1989).

Estudos bioquímicos foram realizados no fim dos anos 70, com objetivo de elucidar os componentes da membrana basal, utilizando o modelo de sarcoma Engelbrecht Holm-Swarm (EHS) em camundongos (Orkin *et al.*, 1977; Chung, Freeman e Braginski, 1977). Esses estudos levaram ao isolamento de grandes quantidades de laminina (Timpl *et al.*, 1979; Chung *et al.*, 1979), colágeno tipo IV (Kleinman *et al.*, 1982), nidogênio (Timpl *et al.*, 1983), e perlecana (Hassell *et al.*, 1980) permitindo a elucidação e compreensão das propriedades bioquímicas, interativas das células e da estrutura e função da membrana basal a nível molecular. Os principais componentes da membrana basal que são responsáveis pela arquitetura e pela formação de uma matriz, são isoformas de colágeno tipo IV, laminina, nidogênio/entactina, perlecana e proteoglicanas (Lebleu, MacDonald e Kalluri, 2007).

A laminina e as isoformas de colágeno tipo IV se montam individualmente em superestruturas essenciais para estabilidade da membrana basal (Poschl *et al.*, 2004; Miner *et al.*, 2004). Esses dois componentes possuem diferenças na sua montagem, ligação ao receptor e/ou ligação cruzada, que pode permitir variações na estrutura final, sinalização e estabilidade (Yurchenco, 2011). Nidogênio/entactina e perlecana formam uma ponte com a laminina enquanto as fibras de colágeno formam redes que aumentam a estabilidade e influenciam na integridade estrutural da membrana basal. As lamininas formam folhetos na superfície da célula recrutando lamininas solúveis. Essa estrutura é reforçada através da interação entre as cadeias de diferentes moléculas de laminina e pela ligação entre a região globular da laminina e receptores da superfície celular, como integrinas e distroglicanas (Yurchenco e Schittny, 1990; Takagi *et al.*, 2003). As redes de colágeno IV estabilizam a lamina basal através de suas ligações cruzadas covalentes (Yurchenco, 2011). Proteoglicanas sulfatadas, como agrinas, perlecanas e colágeno tipo XVIII, podem se incorporar na lamina basal e fornecer carga negativa e fatores de crescimento (Iozzo, Zoeller e Nyström, 2009) (Figura 2).

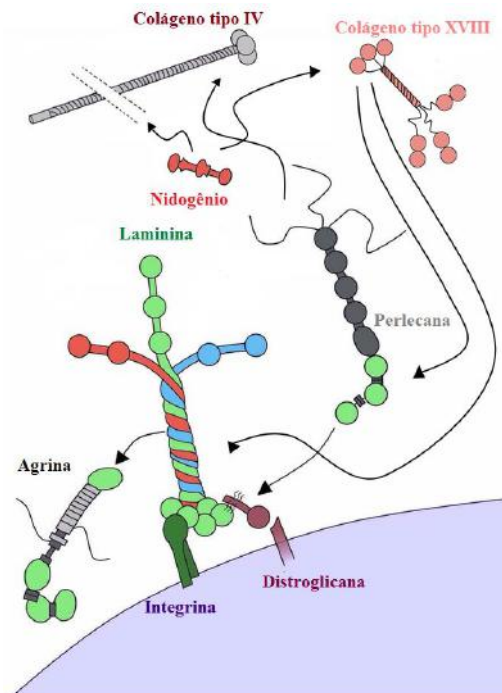


Figura 2: Interações entre a molécula de laminina e seus receptores. Interações entre Moléculas da MEC na membrana basal. Laminina se liga a superfície celular através de receptores como integrina e distroglicana. Agrina e colágeno tipo XVIII se ligam na região *coiled-coil* da laminina. Perlecana também se liga a distroglicana e a colágeno tipo IV. Nidogênio se liga a colágeno tipo IV e a colágeno tipo XVIII. E o colágeno tipo XVIII se liga a perlecana.

Existem diversos outros componentes que podem ser encontrados na membrana basal, incluindo fibulina, agrina, colágeno tipo XV, colágeno tipo XVIII, fibronectina, proteína de membrana basal 90 (BM-90) (Lebleu, MacDonald e Kalluri, 2007), ureína, bamacano, papilina, netrinas e outros (Yurchenco, 2011). Além disso, a membrana basal contém proteínas matricelulares, como osteonectina/SPARC (proteína secretada ácida e rica em cisteína) /BM-40 e nefronectina, que fornecem funções adicionais, muitas vezes específicas de tecidos, mas que não são essenciais para montagem ou arquitetura da membrana (Murphy-Ullrich e Sage, 2014). Esses componentes em menor quantidade são essenciais para especificidade e heterogeneidade da lâmina basal em cada tecido. Diversos fatores de

crescimento/morfogênicos pertencentes à família TGF β são encontrados na membrana basal (principalmente nas cadeias de proteoglicanos sulfato de heparana) e atuam proporcionando sinais específicos a células que estão ligadas a membrana basal (Pozzi, Yurchenco e Iozzo, 2016). Todos esses componentes, organizados ou associados à membrana basal, fornecem suporte a células e tecidos, e atuam como uma base de sinalização complexa.

O colágeno é uma proteína trimérica fibrosa que compõe e fornece estrutura para os ossos, tendões, pele, cartilagem e outros tecidos conjuntivos, sendo a principal substância do tecido conjuntivo. Vertebrados possuem pelo menos 45 genes de colágeno que formam uma família de 28 proteínas conhecidas até o momento (Gordon e Hahn 2010; Ricard-Blum, 2011). As moléculas de colágeno são formadas pela associação de três cadeias polipeptídicas, conhecidas como cadeias α que estão dispostas em forma de tripla hélice. Essas cadeias podem se rearranjar de forma idêntica (colágenos homotrímeros) ou diferente (colágenos heterotrímeros). As moléculas de colágeno possuem cerca de 300 nanômetros de comprimento e 1,5 nanômetros de espessura (Deshmukh *et al.*, 2016). Cada tipo de colágeno pode ser classificado pela sua função, organização molecular e arquitetura.

Colágeno tipo IV é um dos componentes mais abundantes da lâmina basal. Existem três heterotrímeros de colágeno tipo IV, cada um possui uma longa molécula tripla helicoidal (400 nanômetros) com dobras ao longo de seu comprimento e terminando em um domínio globular (NC1). O tipo mais comum, que pode ser encontrado em quase todas as membranas basais, consiste em duas subunidades $\alpha 1$ e uma subunidade $\alpha 2$. Os trímeros de colágeno tipo IV se montam e formam uma rede ramificada com várias cadeias que consistem em dímeros NC1, tetrâmeros aminoterminais e associações laterais (Timpl *et al.*, 1981; Yurchenco e Furthmayr, 1984; Siebold *et al.*, 1987; Yurchenco e Ruben., 1987). Os diferentes tipos de interações entre os protômeros de colágeno tipo IV formam uma estrutura única, essencial para a formação da membrana basal (Lebleu, MacDonald e Kalluri, 2007).

O modelo de sarcoma EHS em camundongos foi fundamental para entender quais são os principais componentes da membrana basal. Atualmente esse modelo tem sido utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em 1986 Kleinman e colaboradores trabalharam com extratos do tumor EHS, nesse estudo, grande parte da matriz foi

extraída utilizando ureia 2 M, centrifugada e dializado com PBS (Kleinman *et al.*, 1986). A solução resultante quando aquecida a 37 °C formou um gel transparente e forte. Esse gel recebeu o nome de matrigel por John Hassell (Hospital Shriners para crianças Tampa, FL). Os principais componentes do matrigel são: colágeno tipo IV, laminina-111, entactina e HS. Fatores de crescimento também foram identificados: TGF β (fator de crescimento transformador beta), FGF (fator de crescimento fibroblástico), EGF (fator de crescimento epidermal), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) (Kleinman e Martin, 2005). Diferentes tipos de matrigel podem ser formados, com maior quantidade de colágeno, laminina, ou sem fatores de crescimento.

Em estudos *in vitro*, matrigel pode ser utilizado de diversas formas; pode-se estudar reguladores de angiogênese, reguladores de genes (Arderiu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013) e invasão celular (Albini e Noonan, 2014). Em culturas tridimensionais de tumor, pode ser utilizado para estudar diferenciação, explantes, cocultura e esferoides tumorais multicelulares (Charoen *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2006), que mimetizam além da arquitetura do tumor, expressão de genes e resposta a fármacos. Em pesquisas *in vivo* pode ser usado em xenoenxerto com objetivo de aumentar o crescimento de células tumorais, células de medula tumorais e células não tumorais (Benton *et al.*, 2011). Matrigel também pode ser utilizado em estudos que queiram mimetizar a adesão bacteriana a MEC (Sánchez *et al.*, 2009; Lobo, 2006), inibição da adesão bacteriana (Horie *et al.*, 2002) e invasão de bactérias (Lähteenmäki *et al.*, 1995; Andrian, Grenier e Rouabhia, 2004). Esse modelo pode ser importante para definir em quais moléculas bacterianas conseguem se aderir e como bactérias interagem com a membrana basal.

1.1.2 Laminina

A laminina é um importante constituinte da membrana basal, sendo uma das proteínas mais expressas da MEC (Durbeej, 2010). Possui diversas funções, como embriogênese, maturação vascular e desenvolvimento muscular (Colognato e Yurchenco, 2000; Miner *et al.*, 2004; Hallmann *et al.*, 2005; Yao, 2016). É um grupo de

glicoproteínas heteroméricas em forma de T ou em forma de cruz, de aproximadamente 400 a 900 kDA, formada por uma cadeia α , uma β e uma γ . Diferentes combinações dessas cadeias originam um grande número de moléculas de laminina (Durbeej, 2010). Em ratos e humanos foram identificadas cinco cadeias α , quatro β e três γ (Aumailley *et al.*, 2005). As subunidades de laminina podem montar até 45 isoformas de laminina. Entretanto, até o momento apenas 18 moléculas de laminina foram descritas em mamíferos e dentre essas 18, três isoformas ainda necessitam de confirmação (Durbeej, 2010).

Cada cadeia consiste em domínios globulares de laminina (LG), repetições chamadas fatores de crescimento epidermal (LE) e um domínio trimérico em espiral enovelada (*coiled-coil*) (Aumailley *et al.*, 2005). O domínio globular inclui o domínio N-terminal de laminina (LN), o domínio globular de laminina *four* (LF) e domínio globular de laminina 4 (L4). As cadeias separadas são mantidas unidas pelas regiões *coiled-coil* por pontes dissulfeto (Ekblom, Lonai e Talts, 2003; Miner e Yurchenco, 2004). A isoforma mais estudada é a laminina-111, sendo composta por $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (Ekblom, Lonai e Talts, 2003). A cadeia $\alpha 1$, contém um domínio LN na região N-terminal, seguido por domínios globulares alternados de L4 e LE, um domínio *coiled-coil* e cinco domínios LG homólogos na região C-terminal. As cadeias β e γ , comparadas com a cadeia α , possuem domínios similares na região N-terminal, mas não possuem domínios LG na região C-terminal (Aumailley *et al.*, 2005).

Essa isoforma se liga a moléculas da MEC e possui em sua estrutura, locais de ligação a nidogênio, agrina, perlecanas, fibrilina-1, heparina e sulfatides (Durbeej, 2010). Na molécula de laminina, os sítios que são responsáveis pela interação laminina-MEC, estão localizados nas cadeias curtas das três subunidades (Durbeej, 2010). A interação laminina-receptor ocorre nos domínios N e C-terminal da cadeia α (Miner e Yurchenco, 2004). Dentro do retículo endoplasmático rugoso, subunidades de lamininas individuais são glicosiladas com oligossacarídeo manose no domínio N-terminal, a glicosilação estabiliza as subunidades e protege os produtos da degradação (Morita, Sugimoto e Kitagawa, 1985). Após a glicosilação, uma vez secretadas, as lamininas junto com outras proteínas da MEC, incluindo colágeno IV e nidogênio, formam a chamada membrana basal. Não se sabe ao certo o mecanismo de formação da membrana basal, mas acredita-se que a ligação laminina-nidogênio tenha uma importante função nesse processo (Kohfeldt *et al.*, 1998).

1.2 Adesão bacteriana

O processo de adesão bacteriana a superfícies celulares tem sido estudado há mais de 100 anos. Em 1908, Guyot descobriu que a espécie *Escherichia coli* poderia causar hemaglutinação (Guyot, 1908). Cinqüenta anos depois, em 1957, Duguid e Gillies demonstraram que as fimbrias (descobertas por Houwink e van Iterson em 1949 através de microscopia eletrônica) conseguem se aderir a células animais (Houwink e van Iterson, 1949; Duguid e Gillies., 1957). No fim do século, diversos estudos já haviam identificado que existem estruturas específicas que medeiam a adesão, conhecidas como adesinas (Ofek *et al.*, 1975; Nesbitt *et al.*, 1982). Atualmente, a relação entre o tropismo bacteriano, patogênese de infecções e a capacidade de adesão é bem estabelecida para diversas espécies (Satterwhite *et al.*, 1978; Scheld, Valone e Sande, 1978; Silverblatt, 1974; Watt e Ward, 1980). Estudos visando a identificação de receptores específicos para adesinas em tecidos e células (Leffler e Svanborg-Eden, 1980; Ofek, Mirelman e Sharon, 1977; Simpson e Beachey, 1983) e terapias anti-adesão se apresentam como uma maneira alternativa de tratar infecções (Rutter e Jones, 1973).

No ambiente, diversas bactérias estão associadas a superfícies por meio de adesinas que lhes permite resistir à remoção física, como por forças de cisalhamento heterodinâmico (Klemm e Schembr, 2000). Em humanos e outros animais, a adesão é vista como um passo crucial para o estabelecimento de uma infecção, uma vez que bactérias aderidas não são eliminadas por mecanismos de limpeza, como peristaltismo e movimento ciliar, ou mecanismos do sistema imune. A adesão bacteriana a superfícies do hospedeiro confere vantagens como a permanência no ambiente extracelular, colonização ou uma eventual internalização para compartimentos extracelulares, com objetivo de escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro (Ofek, Hasty e Doyle, 2003). Bactérias desenvolveram diversos mecanismos de interação com as células hospedeiras e vias de sinalização celular para facilitar a colonização. Quando elas entram em contato com a superfície das células hospedeiras, detectam alterações nas propriedades físico-químicas no ambiente e podem alterar drasticamente sua fisiologia para responder e adaptar-se (Stones e Krachler, 2016). Essas adaptações podem afetar o

metabolismo bacteriano, respiração, mecanismos de virulência e a regulação da colonização (Stones e Krachler, 2016).

O processo de adesão ocorre em diversas etapas: a superfície bacteriana, assim como substratos adesivos em células e tecidos animais, possuem características de superfície negativas, dessa forma, as bactérias devem superar as forças repulsivas (Ofek, Hasty e Doyle, 2003). Acredita-se que isso possa ser conseguido através de determinantes hidrofóbicos que conduzem a adesão fraca e reversível. A adesão firme e irreversível é o resultado de etapas sucessivas em que adesinas estereoespecíficas se ligam a receptores localizados na superfície do hospedeiro. As forças físicas que impulsionam as interações adesivas podem ser interações iônicas e forças de repulsão ou atração, ligações de hidrogênio, efeito hidrofóbico e complexos de coordenação envolvendo íons metálicos multivalentes (Ofek, Hasty e Doyle, 2003).

A superfície bacteriana é altamente especializada e uma de suas principais finalidades é adesão. Inúmeras estruturas são capazes de mediar adesões específicas ou inespecíficas, as mais conhecidas são fimbrias, pili, invasinas, sistema de secreção do tipo III e proteínas de membrana externa (Klemm e Schembr, 2000). Em alguns casos estruturas bacterianas mimetizam estruturas que se ligariam normalmente a receptores do hospedeiro, como a invasina de *Yersinia* que se liga a integrinas (Isberg, Voorhis e Falkow, 1987). Também existe o caso especial da proteína Tir de EPEC/STEC, a qual é injetada pela bactéria no interior da célula eucariótica e migra para sua membrana, onde servirá como receptor para outra proteína de superfície bacteriana (Lai *et al.*, 2013). Esses exemplos ajudam a entender que adesinas bacterianas são adaptadas para colonização em locais específicos e os seus mecanismos são muito bem conservados.

Foram descritos três tipos principais de interação adesina-receptor (Ofek, Hasty e Doyle, 2003). O primeiro tipo de interação é a ligação de lectinas com estruturas de carboidratos. Esse tipo de interação pode ocorrer quando a lectina está na superfície da célula bacteriana ou do hospedeiro (Ofek e Doyle, 1994), sendo mais predominantemente encontrado na superfície bacteriana, sendo o maior grupo de adesinas já descrito. O segundo tipo de interação, envolve o reconhecimento entre proteínas bacterianas e proteínas complementares no hospedeiro (Ofek, Hasty e Doyle, 2003). Essa interação pode envolver bactérias capazes de se ligar a componentes da MEC, como colágeno, fibronectina, laminina, entre outras (Lantz *et al.*, 1985; Emtidy *et*

al., 1989; Wang *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2006). O terceiro tipo envolve ligações que ocorrem entre as hidrofobinas, que normalmente é a interação entre porções hidrofóbicas de lipoproteínas, geralmente, é uma adesão fraca e reversível (Ofeck, Hasty e Doyle, 2003).

A ligação de bactérias a superfícies de mucosas é um passo crítico na patogênese de muitas infecções. Para algumas bactérias que infectam tecidos mucosos, como trato respiratório, trato urinário e trato gastrointestinal, a expressão de adesinas específicas é um importante fator de virulência. Impedir que uma bactéria consiga se aderir e colonizar um tecido específico pela inibição do reconhecimento de receptores mediado por adesinas, pode vir a ser o suficiente para torná-la menos virulenta. A relação entre virulência e adesão se tornou mais clara em experimentos realizados na década de 70 por Smith e Linggrod, com a adesão da cepa de *E. coli* produtora do pili K-88 à mucosa intestinal de leitões (Smith e Linggood, 1971). Neste estudo, as cepas não produtoras da adesina K-88 não levavam a quadros de diarreia tão frequentemente como cepas que possuíam a K-88. A clonagem de um plasmídeo carregando o gene que codifica a adesina K-88 em cepas não produtoras, demonstrou que essa adesina é essencial para colonização de *E. coli* no intestino, levando a quadros diarreicos (Smith e Linggood, 1971). Outro exemplo a se destacar é a fímbria tipo IV de *Neisseria gonorrhoeae*, essa proteína é um importante fator de virulência, pois a adesão mediada por essa fímbria seria o passo essencial para a invasão e transcitose de células epiteliais (Davies, Koomey e Seifert, 1994).

Adesinas bacterianas também estão envolvidas em processos de invasão por patógenos intracelulares. A invasina SipB (proteína B) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, desempenha um papel importante na eficiência da invasão de SpI-I. Foram construídos mutantes de deleção para análise e entendimento dessa invasina na patogenicidade da espécie *S. typhimurium*. Os resultados mostraram que a deleção de SipB não altera o crescimento dessa bactéria, mas quando comparado a cepa parental *S. typhimurium* (SL1344), a adesão, invasão e virulência do mutante é muito reduzida. Isso indica que a invasina SipB é essencial na patogenicidade dessa espécie bacteriana (Chen *et al.*, 2015).

Outro exemplo de como adesinas podem ter papel importante na patogênese, é a adesina VpadF de *Vibrio parahaemolyticus*, sendo conhecida por ser um causador de

gastroenterite relacionada a ingestão de frutos do mar, além de septicemia e infecções em feridas (Liu e Chen, 2015). Essa adesina consegue reconhecer fibrinogênio e fibronectina. A deleção de VpadF em *V. parahaemolyticus* prejudicou a toxicidade e a capacidade de ligação a células epiteliais, e atenuou a sua virulência em modelo murino. Esses resultados indicam que a adesina VpadF pode vir a ser um mecanismo de virulência muito importante no estabelecimento da infecção da espécie *V. parahaemolyticus* (Liu e Chen, 2015).

1.2.1 Adesão mediada por proteínas de membrana externa (PMEs)

O envelope celular de bactérias Gram negativas é composto por uma membrana interna e uma membrana externa (Tamm, Hong e Liang, 2004). Essas duas membranas são separadas pelo periplasma, que possui uma camada de peptidoglicana. A membrana interna é uma bicamada fosfolipídica, constituída por glicerolfosfolipídeos, que formam uma barreira de permeabilidade entre o exterior e o interior da célula e realizam funções metabólicas. A membrana externa é assimétrica e possui uma composição única. O folheto externo é constituído de lipopolissacarídeos (LPS), uma molécula altamente negativa que está exposta na superfície celular, porém seu folheto interno é composto do mesmo fosfolipídio presente na membrana interna (Tamm, Hong e Liang, 2004).

A membrana externa funciona como uma barreira de permeabilidade de bactérias Gram negativas contra agentes nocivos, como antibióticos e sais biliares (Tommassen, 2010). Essa membrana também abriga lipoproteínas e proteínas de membrana integrais, conhecidas como proteínas de membrana externa (PME). Além das proteínas integrais, a membrana externa também possui lipoproteínas ancoradas a membrana, via região lipídica N-terminal (Tommassen, 2010). PMEs possuem uma arquitetura peculiar, em geral elas se organizam no formato cilíndrico de um barril, o chamado barril- β , que está embebido na bicamada lipídica. A estrutura tridimensional do barril- β é composta por folhas- β orientadas de forma anti-paralela. Essas proteínas são anfipáticas, já que as folhas- β são domínios hidrofóbicos ligados entre si através de

voltas (*loops*) hidrofílicas que estão localizados na superfície e no citoplasma. Proteínas do tipo barril- β são comumente encontradas ainda em cloroplastos e mitocôndrias.

Bactérias Gram negativas precisam que sua membrana externa esteja estável para que possam colonizar diversos ambientes, como solo, água, humanos e outros animais, podendo ser comensais ou patógenos (Nikaido, 2003). Diversas PMEs já foram descritas como responsáveis por adesão a MEC: BB0172 de *Borrelia burgdorferi* que se liga a integrina $\alpha 3 \beta 1$ (Wood *et al.*, 2013), outra PME de *B. burgdorferi* é a BmpA que possui um papel importante no decorrer da infecção se ligando a moléculas da MEC, como a laminina. A proteína de membrana externa P1 de *Haemophilus influenzae* medeia adesão a células epiteliais do trato respiratório (Tchoupa., *et al* 2015) e quatro PMEs de *Fusobacterium necrophorum* medeiam sua adesão a células endoteliais bovinas.

Através de experimentos de deleção de genes, foi possível entender as funções da proteína de membrana externa de *Tannerella forsythia*, OmpA Tf1331, que é responsável pela adesão a fibronectina (Abe *et al.*, 2011). Em 2012, Pinne, Matsunaga e Haake demonstraram através da técnica de microarranjo que PMEs de seis espécies do gênero *Leptospira* conseguem se ligar à fibronectina. Três PMEs, Omp-A, TonB dependente (família de proteínas barril- β) e Omp 34 kilodaltons, foram identificadas como ligantes a fibronectina na espécie *Acinetobacter baumannii* (Smani, McConnell e Pachón *et al.*, 2012).

1.2.2 Adesão a proteínas da matriz extracelular

Durante anos, autores tem demonstrado que componentes da MEC são alvos em potencial para adesão de bactérias patogênicas (Vercellotti *et al.*, 1985; Paulsson, Ljung e Wadström, 1992; Ruggiero e Koch, 2008). Essas moléculas da MEC podem ser expostas por meio de ferimentos na mucosa que podem ser adquiridos de diversas formas, como por escovação, cortes e rompimento do epitélio (Figura 3). Como dito anteriormente, a adesão mediada pela interação proteína-proteína pode envolver bactérias que se aderem a MEC. Existem muitas proteínas bacterianas diferentes que conseguem reconhecer e se ligar a um ou mais componentes da MEC (Patti *et al.*,

1994). Em função da diversidade, essas estruturas microbianas passaram a ser chamadas de MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*/componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz) (Patti *et al.*, 1994).

Para caracterizar uma molécula como MSCRAMM, ela deve estar na superfície da célula bacteriana, deve reconhecer e se ligar a macromoléculas encontradas na MEC, e esse reconhecimento e ligação deve ser de alta afinidade. Uma única MSCRAMM pode se ligar a mais de uma molécula da MEC, como a proteína de membrana externa de *Yersinia enterocolitica* YadA que se liga a colágeno, laminina e a uma isoforma de fibronectina (Emtidy *et al.*, 1989). Outro exemplo é a proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus* que se liga a fibronectina e elastina (Keane *et al.*, 2007).

A presença de MSCRAMMs já foi descrita em diversas espécies de bactérias Gram positivas. Um protótipo de uma nova subfamília de MSCRAMM, SesJ, foi identificado em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo expresso constitutivamente na superfície de *Staphylococcus epidermidis* (Arora *et al.*, 2016). Adesinas de *Lysteria monocytogenes* participam da ligação à fibronectina e possuem envolvimento no desenrolar da infecção. Acredita-se que a ligação à fibronectina funcione como um escape do reconhecimento pelo sistema imune e pode permitir a internalização da bactéria (Gillot, André e Content, 1999). A proteína de camada S, BslA, da espécie bacteriana *Bacillus anthracis*, interage com a MEC pela ligação à laminina (Wang *et al.*, 2016). Chia, Yeh e Chen, em 2000, identificaram uma proteína de superfície de *Streptococcus mutans*, FBP-130, capaz de se ligar a fibronectina e se aderir a células endoteliais *in vitro*. É uma bactéria muito conhecida por colonizar a cavidade oral e ser responsável por diversas infecções nesse sítio, como cáries, e acredita-se que os eventos de adesão na cavidade oral e invasão a células endoteliais, ocorram através da proteína FBP-130 (Chia, Yeh e Chen, 2000).

A capacidade de adesão também já foi descrita em bactérias Gram negativas, sendo fimbrias as adesinas mais comumente expressas. Sua estrutura filamentosa está ancorada a membrana externa e seu fator de adesão ou adesina está localizada na região da ponta da sua superfície conferindo especificidade. Algumas fimbrias, como fimbrias do tipo IV, funcionam não apenas na adesão, mas também como uma força de contração

que proporciona a bactéria melhor contato com a superfície alvo (Pizarro-Cerda e Cossart, 2006). Em *Bordetella pertussis*, a presença da fímbria (FIM) e a hemaglutinina filamentosa (FHA) podem ser antígenos protetores e eficazes, com potencial para uso, em vacinas contra coqueluche em uma próxima geração (Scheller e Cotter, 2015). Em 2008, Ong e colaboradores identificaram uma fímbria tipo III que pode estar relacionada à formação de biofilme em cepas de ExPEC – *E coli* que causa infecções extra-intestinais (Ong *et al.*, 2008).

Como citada anteriormente, a exposição de moléculas da matriz por algum trauma pode ser uma forma de bactérias oportunistas se aderirem e causarem uma posterior infecção. A adesão bacteriana a molécula de laminina já foi descrita em diversas espécies e pode ser vista como um importante passo para invasão do hospedeiro. Uma vez que após o rompimento do epitélio, a membrana basal fica exposta, patógenos podem se ligar a moléculas de laminina e começar o processo de colonização e posteriormente uma infecção. A habilidade de ligação a MEC pode ser importante uma vez que ultrapassando essa barreira, patógenos podem chegar a tecidos mais profundos e a corrente sanguínea. Diversas bactérias possuem proteínas de superfície que são conhecidas por se aderir a laminina, como *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pestis* (a partir da PME) Ail (Yamashita *et al.*, 2011), *Streptococcus agalactiae* com a adesina Lmb (Spellerberg *et al.*, 1999), proteína Tp0136 de *Treponema pallidum* (Brinkman *et al.*, 2008). Eiring e colaboradores em 1995 demonstraram que cepas de *Bacteroides fragilis* conseguem se aderir melhor a laminina que outras espécies clinicamente relevantes, como *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bacteroides ovatus* (Eiring *et al.*, 1995).

A adesão da bactéria *Helicobacter pylori* a laminina foi recentemente atribuída a ligação da PME SabA (molécula de ligação a ácido siálico) a porções siálicas na molécula de laminina. Essas porções ainda não foram elucidadas, porém essa PME pode ter um reconhecimento mais amplo de ácido siálico, se ligando a regiões que podem estar presentes na laminina (Walz *et al* 2005).

A Proteína F de *H. influenzae* consegue mediar à adesão a moléculas de laminina e células epiteliais pulmonares de humanos. Análises com peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes demonstraram que a região N-terminal da proteína F contém a porção que interage com as moléculas do hospedeiro. Além disso, a proteína F foi

encontrada em todas as cepas clínicas isoladas recentemente e os mutantes isogênicos para proteína F (NTHi Δ hpf) apresentaram uma significativa redução na ligação a laminina e células epiteliais (Jalalvand *et al* 2013).

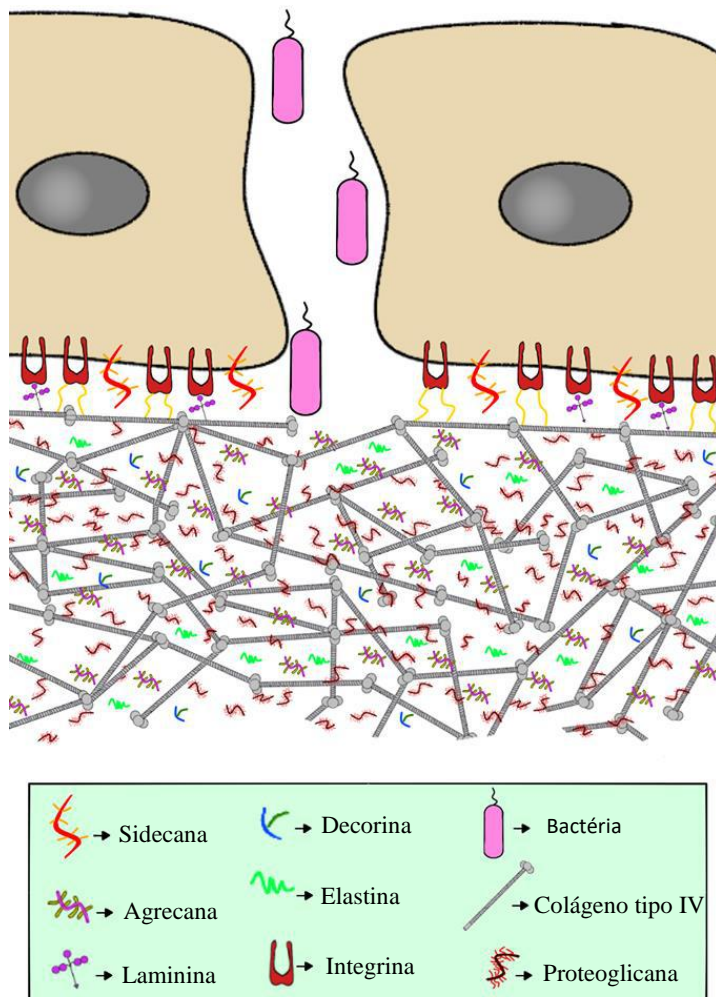


Figura 3: Destruição do epitélio e ligação a moléculas da MEC. Ilustração da entrada de bactérias a partir de um rompimento no epitélio e exposição de moléculas da MEC como colágeno tipo IV, Laminina, entre outras a patógenos.

1.2.3 Adesão de bactérias anaeróbias

Em 1861, Louis Pasteur fez o primeiro cultivo de uma bactéria anaeróbia, hoje em dia conhecida como *Clostridium septicum*. Porém, desde os tempos de Hipócrates, já houveram descrições de organismos que conseguiam viver na ausência de oxigênio. Isso demonstra que esses microrganismos sempre coexistiram e evoluíram com seu hospedeiro e sempre tiveram um papel importante na microbiologia clínica. Por serem microrganismos de difícil cultivo e isolamento, apenas nos últimos anos essas espécies bacterianas começaram a ter um destaque maior na clínica médica, através do aprimoramento de técnicas de detecção, cultivo e identificação, sendo essencial para muitas das etapas de processamento dos espécimes clínicos a manutenção de uma atmosfera diferenciada para sobrevivência microbiana (García-Sánchez *et al*, 2015).

Esse grupo microbiano é constituído por importantes componentes da microbiota intestinal e de outros sítios, atuando na produção de proteínas, protegendo contra invasão de outros patógenos e tendo papel fundamental na regulação e ativação do sistema imune (Sekirov *et al.*, 2010). Bactérias anaeróbias também têm sido descritas como possíveis probióticos, principalmente o gênero *Bifidobacterium*. As bactérias que compõe esse gênero conseguem colonizar muito bem o intestino de humanos, insetos e outros animais (Mitsuoka, 1992). Por conta dessa colonização, essas bactérias previnem a adesão de patógenos a mucosa intestinal, além de produzir vitaminas e metabólitos necessários para o hospedeiro (Chen, Wang e Zhang, 2010). Essas bactérias também são utilizadas para fins biotecnológicos, como, biodegradação (degradação de substâncias aromáticas e/ou halogenadas), biossíntese (fermentações normais e modificadas) e biotransformação (produção de compostos quirais, através de uma série processos) (Morris, 1994). A presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* na microbiota da cavidade vaginal está associada à saúde da mulher, uma vez que essas bactérias mantem o pH ácido da região, assim, protegendo contra patógenos (Borges, Silva e Teixeira, 2014). Esses estudos demonstram como bactérias anaeróbias são importantes tanto para os humanos, quanto para outros animais e para o uso em biotecnologia.

Porém, estas bactérias também têm sido associadas como agentes de diversos processos infecciosos no trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário feminino, como patógenos únicos ou em associação com outros microrganismos facultativos ou anaeróbios. Esses microrganismos estão associados a diversas infecções nas vias aéreas

inferiores, como, pneumonia, abscesso pulmonar, pneumonia necrotizante e empiema (Bartlett, 2012). Também podem estar associados a infecções nos membros inferiores de pacientes com diabetes, sendo infecções que podem levar a perda de mobilidade e até morte (Charles *et al* 2015). Anaeróbios estão relacionados à bacteremias, em crianças, recém-nascidos e adultos. Essas infecções normalmente são polimicrobianas e estão relacionadas a diversos fatores, como imunossupressão, diabetes, uso de medicamentos, cirurgia, insuficiência renal crônica, entre outros (Brook, 2010). Diversas revisões relacionam bactérias anaeróbias a quadros de endocardite e pericardite, como possível causa dessas infecções (Brook, 2009; 2008; 2002; Kentos *et al.*, 1994).

Diversos mecanismos de virulência já foram descritos para bactérias anaeróbias. Como a presença de uma cápsula polissacarídea, em *B. fragilis*, que demonstrou ser um fator muito importante na indução de abscessos (Tzianabos, Kasper e Onderdonk, 1995). A presença da cápsula também foi descrita no gênero *Fusobacterium* (Brook e Walker, 1985 e 1986), *Prevotella* e *Porphyromonas* (Brook, 1994) e na espécie *Clostridioides difficile* (Davies e Borrielo, 1990). Outro fator de virulência são as toxinas, presentes em diversas espécies do gênero *Clostridium* (Alves *et al.*, 2013; Kuehne *et al.*, 2010; Sirigi Reddy *et al.*, 2014; Barash e Arnon, 2014) e também do gênero *Bacteroides* (Myers *et al.*, 1984). Enzimas e polissacarídeos são fatores de virulência também descritos e conhecidos (Hofstad, 1992). Dois fatores de extrema importância são as fimbrias e as proteínas de membrana externa, presentes em bactérias Gram negativas. Esses dois fatores são essenciais para etapas como adesão dessas bactérias a superfícies tanto bióticas quanto abióticas, e como dito anteriormente, a adesão é um dos passos essenciais para colonização e posterior estabelecimento de uma infecção.

Alguns estudos demonstraram a capacidade de adesão de bactérias anaeróbias a componentes da MEC, por exemplo, a espécie *C. difficile*, conhecida pelo aparecimento de cepas hipervirulentas nos últimos anos e por ser causadora de colite pseudomembranosa (Burke e Lamont, 2014). Suas proteínas de camada S (*S-layer*) se ligam a colágeno, vitronectina e trombospondina (Calabi *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram que a proteína de ligação à fibronectina Fbp68 de cepas 79-685 de *C. difficile* foi identificada como uma importante adesina, se ligando a fibronectina solúvel ou imobilizada e ao fibrinogênio (Hennequin *et al.*, 2003). Outra espécie de *Clostridium* capaz de se aderir é a *C. thermocellum* que consegue se aderir à celulose (Bayer, Kenig

e Lamed, 1983). *B. fragilis*, é outra bactéria anaeróbia de importante papel na clínica, frequentemente isolada de infecções intra-abdominais e de bacteremias (Wick e Sears, 2010). Já foi demonstrado que as cepas de *B. fragilis* 1081 e MC2 se aderem à laminina tipo 1 de forma dose dependente (Ferreira *et al.*, 2006). Também foi identificada uma glicoproteína de ligação ao colágeno, chamada de Cbp1. Sua função foi confirmada através da inativação do gene *cbp1* que resultou em uma perda significativa da adesão ao colágeno, na cepa clínica isolada de *B. fragilis* GSH18 (Galvão *et al.*, 2014). Além disso, *B. fragilis* e *B. vulgatus* possuem habilidade de se aderir à fibronectina e vitronectina, e essa adesão foi proposta como um mecanismo de patogenicidade (Nagy, Manncke e Werner, 1994).

Espécies do gênero *Lactobacillus* são muito encontradas na microbiota do trato gastrointestinal e seus mecanismos de adesão são muito importantes para colonização das espécies. Na espécie *Lactobacillus crispatus*, cepa JMC 5810, foi demonstrado a adesão a moléculas da MEC utilizando matrigel de células de sarcoma de camundongos, células 407 de intestino humanas e moléculas de colágeno (Toba *et al.*, 1995). O mesmo grupo caracterizou e nomeou a adesina de superfície de CbsA (proteína A de camada S de ligação a colágeno) (Sillanpää *et al.*, 2000). Horie e colaboradores em 2005 descreveram que oito espécies de *Lactobacillus gasseri* isoladas de fezes, quando crescidas em anaerobiose, demonstravam uma alta taxa de adesão a moléculas da MEC, como laminina e fibronectina (Horie *et al.*, 2005). O mesmo não foi demonstrado para todas as espécies isoladas, apenas uma cepa de *Lactobacillus johnsonii* demonstrou uma forte adesão quando crescida também em anaerobiose.

Outra espécie anaeróbia, *Gardnerella vaginalis*, é encontrada na cavidade vaginal, sendo muito relacionada a presença de vaginose bacteriana, quando se tem um decréscimo de espécies do gênero *Lactobacillus*. Patterson e colaboradores em 2010 analisaram a adesão de *G. vaginalis* e de outros anaeróbios presentes no canal vaginal. Foi observado que a *G. vaginalis* e o gênero *Peptoniphilus* exibiram uma taxa alta de adesão a células epiteliais, sendo uma adesão mais agregada e outra uma adesão homogênea, respectivamente (Patterson *et al.*, 2010).

Winker e colaboradores (1987) demonstraram que *Fusobacterium nucleatum*, um importante patógeno da cavidade oral relacionado a casos de periodontite e formação de biofilme, consegue se aderir significativamente ao modelo de membrana

basal *in vitro* (Winkler *et al.*, 1987). O mesmo estudo demonstrou que cepas de *F. nucleatum* também conseguem se aderir a moléculas de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina. *Fusobacterium necrophorum* é um dos principais causadores da síndrome de Lemierre que leva a um quadro de inflamação na garganta, que se propaga para a veia jugular interna. Já foi relatada adesão dessa bactéria a células *Vero* (Kanoë, Nagai e Toda, 1985) e a células de diferentes animais, como porco, camundongo e bode (Okada *et al.*, 1999). *Propionibacterium acnes* também possui a capacidade de se aderir a superfícies abióticas em recipientes de armazenamento de plaquetas (Kumaran *et al.*, 2014).

Outra bactéria que possui a capacidade de adesão à MEC é a *Porphyromonas gingivalis*, sendo uma espécie muito relacionada a doenças periodontais. Essa bactéria consegue se ligar à laminina, colágeno e fibronectina por meio de um apêndice fibrilar proteico (Kontani *et al.*, 1995), além de também conseguir se aderir a fibrinogênio (Lantz *et al.*, 1991 e 1986).

Bactérias anaeróbias são capazes de colonizar diversos sítios do corpo, por mais que precisem de uma atmosfera diferenciada para viver. São conhecidas por habitarem o trato gastrointestinal, cavidade vaginal, cavidade oral, trato respiratório inferior e algumas regiões da pele. São microrganismos relacionados a saúde, mas também podem estar ligados a infecções. É de suma importância entender como funcionam os mecanismos de colonizações dessas bactérias, principalmente dos colonizadores da cavidade oral, um local relacionado a infecções sistêmicas e crônicas do corpo.

1.3 Gênero *Prevotella*

O gênero *Prevotella* é constituído por bacilos Gram negativos, anaeróbios estritos, não formadoras de esporo e classificados como produtores de pigmento, formando colônias brilhantes e suaves na cor cinza, preta, ou castanho claro em placas de Agar sangue, sendo características importantes para sua identificação (Summanen *et al.*, 1998). As bactérias que constituem esse gênero são conhecidas como sacarolíticas, ou seja, conseguem metabolizar sacarose, além disso, elas conseguem produzir fluorescência sob luz negra de ondas longas. Esse gênero bacteriano requer meios ricos

para crescimento, contendo peptona ou *tripticase*, além de extrato de levedura e suplementos como hemina e menadiona para viabilidade. Essas espécies produzem principalmente succinato e acetato, com alguma quantidade de formiato, isobutirato e isovalerato (Holdeman, Cato e Moore, 1977; Holdeman, Kelley e Moore, 1984; Iki *et al.*, 1997). Uma vez que essas bactérias dificilmente utilizam aminoácidos para fermentação, acredita-se que haja um transporte de peptídeos, hidrólise desses peptídeos em aminoácidos e depois a metabolização (Pittman, Kakshamanan e Bryant, 1967; Wahren e Gibbons, 1970).

As espécies desse gênero são muito versáteis, podendo ser encontradas em diferentes sítios do corpo humano, como a mucosa orofaríngea, trato respiratório superior, trato urogenital (Eiring *et al.*, 1998), e trato gastrointestinal (Hayashi *et al.*, 2007). Muitas espécies de *Prevotella* estão associadas a processos infecciosos, principalmente na cavidade oral, sendo relacionadas a dor e inchaço (Gomes, Drucker e Lilley, 1996; 1994), porém as bactérias que compõe esse gênero também têm sido associadas a infecções em outros sítios do corpo, incluindo infecções do trato respiratório, sistema nervoso central, região abdominal, trato urogenital e bacteremias (Jousimies-Somer *et al.*, 2002).

Um estudo realizado em 2017, por Ravela e colaboradores, foram analisados swabs vaginais de mais de 100 mulheres saudáveis, de diferentes etnias e em idades reprodutivas. Nesse estudo, isolados do gênero *Prevotella* foram detectados em 68,8% das amostras, o que demonstra a presença dessa bactéria colonizando a cavidade vaginal (Ravela *et al.*, 2017). Espécies de *Prevotella* também já foram relacionadas a uma melhora no metabolismo da glucose e no aumento do estoque de glicogênio hepático (Kovatcheva-Datchary *et al.* 2015). Em outro estudo, pacientes que sofriam de constipação intestinal foram tratados com um produto natural a base de levedo da cerveja (EpiCor®), o tratamento trouxe melhora significativa para os pacientes e demonstrou o aumento de bactérias dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* no trato gastrointestinal, demonstrando a importância desses dois gêneros para o funcionamento regular do intestino (Pinheiro *et al.*, 2017).

Prevotella intermedia, *Prevotella dentalis*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica* são conhecidas por serem patogênicas em diversas situações e por invadir os tecidos do hospedeiro (Nadkarni *et al.*, 2012). *Prevotella buccae* já foi

isolado em abscesso localizado em um cisto no seio, o que foi um achado incomum, uma vez que essa espécie nunca havia sido relacionada a esse tipo de infecção (Cobo *et al.*, 2017). Em outro quadro infeccioso, *Prevotella disiens* e *Staphylococcus epidermidis* foram isoladas de material tecidual e ósseo do cérebro de um paciente que havia passado por uma cranioplastia (Thomaidis *et al.*, 2015). Outro exemplo foram os achados do grupo Mehmood e colaboradores, que isolaram *Prevotella loescheii* de infecção de tecidos moles e pele de pacientes que passaram por cirurgia bariátrica (Mehmood *et al.*, 2014).

Recentes estudos vêm demonstrando o papel das espécies de *Prevotella* nas doenças relacionadas à disbiose, como artrite reumatoide, esteatose hepática não alcoólica e tireoidite de Hashimoto. Maeda e colaboradores (2016) constatou que camundongos *germ-free*, quando colonizados com *Prevotella copri* e tratados com um antifúngico Zimosan, tem um aumento na produção de células Th17 no intestino (Maeda *et al.*, 2016). Além disso, foi observado nos linfonodos a presença da interleucina IL-17 que responde ao autoantígeno (proteína L23a) relacionado a artrite reumatoide, que rapidamente gera um caso de artrite. Ishaq e colaboradores em 2017 observaram a microbiota de pacientes que possuem a tireoidite de Hashimoto e pacientes saudáveis através de técnicas de DGGE e PCR em tempo real. Foi encontrado um declínio de *Prevotella* e *Diallister* e um aumento de *Escherichia-Shigella* e *Parasutterella* (Ishaq *et al.*, 2017). Faria Ghetti e colaboradores no ano de 2017 realizaram um levantamento de trabalhos que tentava entender a modificação da microbiota intestinal em pacientes com esteatose hepática não alcoólica, e foi visto que a maior parte dos resultados demonstravam uma diminuição de *Prevotella* e um aumento de *Bacteroides* (de Faria Ghetti *et al.*, 2017). Esses trabalhos evidenciam e reforçam que a presença de bactérias do gênero *Prevotella* são essenciais para o equilíbrio do organismo.

1.3.1 *P. intermedia*

Como dito anteriormente, espécies de *Prevotella* são muito associadas a infecções na cavidade oral. *P. intermedia* é uma das espécies desse gênero mais relacionada a doenças na cavidade oral, como a doença periodontal (Maeda *et al.*, 1998; Ashimoto *et al.*, 1996), periodontite apical (Gomes, Drucker, Lilley, 1996 e 1994; Jacinto *et al.*, 2003) e estomatite gangrenosa, uma infecção bacteriana destrutiva dos

tecidos faciais e bucais (Bolivar *et al.*, 2012; Enwonwu, Falkler e Idigbe, 1999). Além de estar envolvida em infecções orais, a espécie *P. intermedia* já foi associada à fibrose cística e bronquite crônica (Ulrich *et al.*, 2010; Brook e Frazier, 2003).

A doença periodontal apresenta grande risco para saúde, uma vez que dados epidemiológicos demonstraram que a periodontite é um importante fator de risco para doenças coronarianas (DeStefano *et al.*, 1993; Mattila *et al.*, 1989). Além disso, a periodontite pode ter uma relação com quadros de hipertensão em pacientes que possuem doenças coronarianas. Aoyama e colaboradores, em 2017 demonstraram uma possível associação entre as duas doenças. Foram encontrados em seu estudo um número alto de patógenos periodontais específicos, *P. intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em homens com hipertensão quando comparados com o grupo sem o quadro de hipertensão (Aoyama *et al.*, 2017). Uma possível sugestão é que a disfunção vascular e endotelial ocasionada pela doença periodontal, pode vir a ser um fator de aumento da pressão sanguínea (Macedo, Paizan e Vilela-Martins, 2014).

Receptores do tipo Toll-like (TLR-4) reconhecem diversos patógenos periodontais, principalmente através de estruturas como LPS de bactérias Gram negativas. Diversos estudos descreveram a presença de *P. intermedia* em tecidos da placenta de pacientes com pré-eclampsia, as mesmas pacientes apresentaram um aumento na expressão de TLR-4 e do fator nuclear kappa b (NF-κB). Receptores TLR-4 levam a uma ativação de NF-κB, iniciando a transcrição de genes de diversas citocinas e mediadores inflamatórios que vão gerar a alteração dos vasos placentários, levando assim a um quadro de pré-eclampsia (Kim, Romero e Oh, 2005; Baeuerle e Henkel, 1994; Tanbe e Khalil, 2010; Parthiban *et al.*, 2017). Esses estudos evidenciaram que a presença de determinadas espécies bacterianas na placa dentária, pode estar associadas a diversas doenças inicialmente não relacionadas.

Os mecanismos de patogenicidade dessa espécie ainda não são bem elucidados, porém uma série de trabalhos tentou demonstrar possíveis fatores de virulência. Shibata, Fujimura, e Nakamura em 1993 caracterizaram proteases, principalmente a elastase, que é capaz de degradar o tecido gengival (Shibata, Fujimura e Nakamura, 1993). Jansen, Grenier e Van der Hoeven, em 1995, caracterizaram a produção de proteases capazes de degradar Imunoglobulina G (Jansen, Grenier e Van der Hoeven, 1995), enquanto Dorn, Leung e Progulsk-Fox demonstraram em 1998 que cepas de *P. intermedia* 17 possuem

habilidade de invadir células epiteliais da cavidade oral humana (Dorn, Leung e Progulske-Fox, 1998). Yu e colaboradores em 2006 identificaram e caracterizaram proteínas de superfícies da cepa *P. intermedia* 17 que são capazes de se ligar a proteínas de MEC (Yu *et al.*, 2006). Em 2014, um novo mecanismo de patogênese foi descoberto por Matsui e colaboradores. Eles descreveram que uma espécie de *P. intermedia* é capaz de desabilitar e matar efetivamente neutrófilos, oferecendo certa proteção para outros patógenos e levando uma persistência da infecção (Matsui *et al.*, 2014). Doke e colaboradores em 2017 relataram que nucleases de *P. intermedia* são capazes de degradar as redes de neutrófilos (NETs), sendo mais um mecanismo de patogenicidade que pode favorecer a persistência da infecção dessa espécie e de outros microrganismos (Doke *et al.*, 2017).

1.3.2 *P. nigrescens*

Em 1992, Shah e Gharbia propuseram uma nova espécie, *P. nigrescens*. Com base em estudos no DNA, essa nova espécie foi separada do grupo da espécie *P. intermedia* (Shah e Gharbia, 1992). Um dado interessante, é que uma cepa de *P. nigrescens* produz uma bacteriocina, conhecida como nigrescina, que possui atividade antimicrobiana contra outras bactérias da cavidade oral e também produz um efeito citotóxico em fibroblastos localizados na gengiva, podendo ser caracterizado como uma importante substância para o tratamento de infecções orais (Kaewsrichan *et al.*, 2004). Porém as duas espécies fazem parte da microbiota oral e parecem estar relacionadas a bactérias do complexo vermelho de placa subgengival e supragengival, como, *P. gingivalis*, *T. denticola*, e *T. forsythia* (Haffajee *et al.*, 2008). Em 2013, Stingu e colaboradores associaram quadros de periodontite a expansão da colonização por *P. nigrescens* (Stingu *et al.*, 2013). Mullally e colaboradores em 2000 encontraram a espécie *P. nigrescens* em quase 70% das amostras de placa subgengival de pacientes com formas localizadas e generalizadas de periodontite (Mullally *et al.*, 2000). Em contraste, outro trabalho demonstrou que *P. nigrescens* aparece com mais frequência em grupos controle comparado com pacientes em quadro de periodontite crônica (Teaupaisan, Douglas e Walsh, 1995). Além disso, a detecção de *P. nigrescens* na saliva de crianças periodontalmente saudáveis também já foi relatada (Kuboniwa *et al.*, 2004; Kulekci *et al.*, 2008), indicando que essa espécie constitui a microbiota oral, mas atua como um patógeno oportunista.

Em 2017, Corrêa e colaboradores observaram a disbiose na microbiota da cavidade oral em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, e encontraram um aumento de *P. nigrescens* em pacientes com lúpus que não possuíam periodontite (Corrêa *et al.*, 2017). Essa espécie já foi relacionada a infecções extraorais. No ano de 2013 um caso de celulite infecciosa foi reportado por Yang e colaboradores, tendo como causa uma co-infecção de *P. nigrescens* e *Streptococcus viridans* (Yang *et al.*, 2013). Yakob e colaboradores em 2011 demonstraram uma forte associação na presença de *P. nigrescens* em pacientes com arteriosclerose na carótida e que possuíam um quadro de periodontite (Yakob *et al.*, 2011).

Alguns mecanismos de virulência dessa espécie já foram descritos. Em 2012, Palmer e colaboradores descreveram que bactérias presentes na cavidade oral, incluindo *P. nigrescens*, possuem a capacidade de degradar DNA extracelular, ou seja, possuem uma atividade de DNase, podendo ser importante na sua patogênese de evasão de neutrófilos (Palmer *et al.*, 2012). Miyashita e colaboradores em 2010 descreveram uma proteína de *P. intermedia* capaz de se aderir a superfície de hemoproteínas, na presença de um pH alcalino, sendo um fator importante para a aquisição de ferro dessa bactéria (Miyashita *et al.*, 2010). Em 2009, Itoh e colaboradores sugeriram que *P. nigrescens* é capaz de ativar metaloproteases 2 e 9 que são capazes de degradar proteínas de MEC e que auxiliam na destruição do tecido periapical (Itoh *et al.*, 2009). Em 2005, Kim e colaboradores demonstraram que o LPS de *P. nigrescens*, sozinho, sem adição de interferon-gama (INF- γ) é capaz de induzir a expressão de iNOS e a produção de NO em células RAW264.7, uma linhagem celular de macrófagos de murinos, podendo ser importante para estabelecimento de uma lesão crônica acompanhada de destruição do tecido ósseo em doenças periodontais e infecções endodônticas (Kim *et al.*, 2005). Em 1996, Lillo e colaboradores demonstraram que as espécies *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* e *P. gingivalis* conseguem se ligar e degradar lactoferrina, sendo um importante fator de virulência (Lillo *et al.*, 1996), uma vez que já demonstraram que a lactoferrina possui fortes efeitos bacteriostáticos e bactericidas, e tem papel importante na regulação de diversos mecanismos do sistema imune (Sanchez, Calvo e Brock, 1992).

1.3.3 *P. melaninogenica*

A espécie *P. melaninogenica*, antes conhecida como *Bacteroides melaninogenicus* (Shah e Collins, 1990), é considerada um membro da microbiota oral humana, podendo ser isolado da língua, saliva, sulco gengival e da placa dental de indivíduos saudáveis (Könönen, 1993; Bik *et al.*, 2010). Em 2015, de Steenhuijsen Piters e colaboradores observaram a composição da microbiota do trato respiratório inferior em pacientes com pneumonia e pessoas saudáveis e observaram uma associação positiva entre a presença de *P. melaninogenica* e pacientes saudáveis (de Steenhuijsen Piters *et al.*, 2016). Por outro lado essa espécie quase não está presente colonizando o trato respiratório inferior de pacientes com pneumonia, indicando um possível efeito protetor da colonização pela espécie. Também em 2015, Larsen e colaboradores demonstraram que espécies do gênero *Prevotella*, incluindo *P. melaninogenica*, não levam a uma ativação tão exacerbada de mediadores inflamatórios, como TLR-2, logo, o sistema imune do trato respiratório inferior é mais tolerante a presença dessas bactérias na microbiota (Larsen *et al.*, 2015).

Em 2014, Triches e colaboradores identificaram a presença de *P. melaninogenica* em mais de 88% dos pacientes com lesões periradiculares e necrose da polpa dentária (Triches *et al.*, 2014). Hsiao e colaboradores em 2012 descreveram a presença de *P. melaninogenica* em paciente com infecções endodônticas (Hsiao *et al.*, 2012). Essa espécie já foi detectada na placa supragengival de crianças, independentemente da idade, juntamente com as espécies *P. intermedia* e *P. nigrescens* (Tanaka *et al.*, 2008). *P. melaninogenica* também já foi isolada de pacientes diagnosticados com periodontite (Maestre *et al.*, 2007).

Em 2017, Langevin e colaboradores observaram que a presença de *P. melaninogenica* na microbiota da nasofaringe aumenta consideravelmente em crianças com quadros graves de infecção por influenza (Langevin *et al.*, 2017). No ano de 2016, Adams e Kern, apresentaram um caso de abscesso na glândula pituitária causado por *P. melaninogenica*, mas não se sabe a relação dessa bactéria com o quadro infeccioso, uma vez que a paciente não tinha nenhum tipo de infecção na cavidade oral (Adams e Kern, 2016). No mesmo ano, Beatty e colaboradores também observaram a presença dessa bactéria em um quadro de abscesso na glândula pituitária (Beatty *et al.*, 2016).

Diferente de outras bactérias orais, *P. melaninogenica* não recebe tanta atenção, por não estar muito associada a doenças extraorais, como arteriosclerose,

pneumonia, doenças cardiovasculares, como *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Li *et al.*, 2000; Moutsopoulos e Madianos, 2006). Porém, em 1980, Griffee e colaboradores relacionaram a presença dessa espécie em canais no dente, com o aparecimento de dor, odor fétido e formação do trato sinusal, resultando em um espaço morto com potencial para formação de abscessos (Griffee *et al.*, 1980). Tunney e colaboradores, em 2008, isolaram a espécie *P. melaninogenica* do escarro de pacientes com fibrose cística (Tunney *et al.*, 2008). Alguns fatores de virulência já foram descritos na literatura, como produção de hemolisina em algumas cepas de *P. melaninogenica* (Hillman *et al.*, 1993), a produção de colagenase (Jun *et al.*, 1989) e expressão de apêndices de superfície bacteriana que podem estar envolvidos em processos de adesão (Hofstad, 1989).

2. Justificativa

Apesar dos inúmeros estudos sobre o gênero *Prevotella* em relação a patogenicidade e outros aspectos, ainda existem diversas lacunas a serem preenchidas sobre patogenicidade das espécies. São espécies constantemente isoladas em sítios infecciosos, e são encontradas em biofilmes bacterianos da cavidade oral. Levando em consideração que infecções na cavidade oral podem aumentar o risco de infecções sistêmicas, e as espécies de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. melaninogenica* são constantemente isoladas nessa região, é de grande importância entender como funciona os mecanismos de adesão mediados por PMEs a moléculas da MEC. Estudos anteriores já demonstraram a capacidade de espécies desse gênero de aderirem à laminina e os ligantes bacterianos envolvidos na adesão, porém, não foram completamente descritos. Uma vez que a laminina, é um dos componentes mais encontrados na membrana basal da bolsa periodontal, que representa uma barreira para invasão de tecidos conectivos subjacentes da cavidade oral, a elucidação dos mecanismos de adesão a essas moléculas é de suma importância e pode apresentar novas oportunidades para a prevenção e o combate de doenças causadas por esses patógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente projeto teve como objetivo geral investigar a capacidade de adesão de espécies do gênero *Prevotella* à laminina e identificar adesinas bacterianas responsáveis por essa adesão.

3.2 Etapas do estudo

1. Realizar ensaios quantitativos de adesão de *Prevotella spp.* à laminina.
2. Extração de PMEs das espécies de *Prevotella spp* e determinar o perfil eletroforético desses extratos;
3. Isolar potenciais adesinas dos extratos de PMEs e identificar as proteínas ligantes eluídas da coluna.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

As cepas que foram utilizadas nesse estudo foram cedidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, e são provenientes do *American Type Culture Collection* – ATCC, Rockville, MD, EUA. Duas cepas foram isoladas de processos infecciosos orais e uma cepa foi isolada de escarro (Tabela 1).

Tabela 1: Origem das cepas utilizadas

Cepas	Espécie	Origem	Referência/Ano
ATCC 49046 1988	<i>Prevotella intermedia</i>	Bolsa periodontal	Nakazawa , Zamban e Reynolds., 1988
ATCC 33563	<i>Prevotella nigrescens</i>	Gengivite	Shah e Gharbia, 1992
ATCC 25845	<i>Prevotella melaninogenica</i>	Escarro	Wu <i>et al.</i> , 1992

As cepas bacterianas de *P. intermedia* (ATCC 49046), *P. melaninogenica* (ATCC 25845) e *P. nigrescens* (ATCC 33563) foram cultivadas em meio ágar sangue suplementado (ASS) com menadiona (10 µg/mL – Sigma, St. Louis, MO, EUA) e hemina (0,5 µg/mL – Sigma) com auxílio da alça bacteriológica. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de H₂ e 10% CO₂) por 48 horas a 37 °C (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). Para os experimentos, as colônias foram inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Oxoid™, Cambridge, UK) pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (PRAS), suplementado com menadiona (10 µg/mL - Sigma) e hemina (0,5 µg/mL - Sigma) e incubadas em câmara de anaerobiose por 48 horas a 37 °C (Jousimies-Somer *et al.*, 2002).

4.2 Quantificação da adesão de *Prevotella*

As cepas bacterianas foram cultivadas segundo a metodologia descrita no item 4.1. A proteína laminina tipo 1 (Natural, Mouse, Life Technologies™) foi diluída em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 6,6) para concentração de 0,02 mg/ml (Westerlund *et al.*, 1989). Como controle negativo foi utilizada albumina do Soro Bovino (BSA) diluída em tampão fosfato-salino (PBS 0,01M, pH 7,2) na concentração de 1%. As soluções foram adicionadas a lamínulas estéreis previamente preparadas e distribuídas em microplacas de 24 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL da diluição de laminina, e BSA 1%. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente (25 °C) por 18 horas para adsorção das proteínas. Os poços foram lavados três vezes com solução de PBS (0,01 M, pH 7,2) contendo Tween-20 (0,01%) para retirar proteínas que não se adsorveram à superfície da lamínula. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de BSA (0,1%) e Tween-20 (0,01%) em PBS (0,01 M, pH 7,2) por uma hora. As bactérias crescidas em BHI foram cultivadas por 48 horas em ambiente de anaerobiose e posteriormente centrifugadas a 4000 xg por 10 minutos. Os sedimentos foram suspensos em tampão BLANKS-PRAS (sulfato de magnésio 7x H₂O 0,004 M, fosfato de potássio monobásico 0,0014 M, cloreto de sódio 0,051 M, fosfato de sódio dibásico 0,008 M, cloreto de potássio 0,002 M, tioglicolato de sódio 0,008 M, cisteína 0,004 M, resazurina 2 mL – pH 7,4), ajustados para densidade óptica (DO)_{550nm} de 0,4 (10⁸ UFC/mL), e diluídas para concentração de 10⁷, diluindo 300 µL de cultura a 10⁸ UFC/mL em 2,7 mL de tampão BLANKS-PRAS e 5 x 10⁷ UFC/mL diluindo 1,5 mL de 10⁸ UFC/mL em 1,5 mL de tampão BLANKS-PRAS. Trezentos microlitros das suspensões foram adicionados aos poços, e a microplaca foi incubada por 1 ou 2 horas a 37 °C em câmara de anaerobiose, de acordo com o experimento (Figura 4)

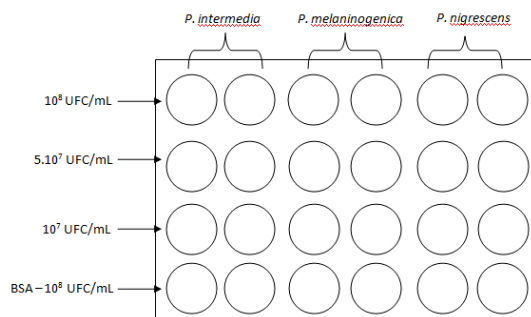


Figura 4: Esquema do experimento em Microplaca. Organização de uma microplaca de 24 poços para o experimento de quantificação de aderência. Diferentes concentrações das cepas de *Prevotella* ssp. foram adicionadas aos poços contendo lâminulas de vidro com laminina immobilizada. Lâminulas recobertas com BSA 1% foram utilizadas como controles negativos para aderência. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Após 1 ou 2 horas, os poços foram lavados três vezes com a solução de PBS (0,01 M) e Tween 20 (0,01%) para retirar bactérias que não se aderiram à laminina. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de formaldeído (3,7%) nos poços, para fixação das bactérias aderidas. Após a incubação de 30 minutos, os poços foram lavados três vezes com água estéril. A coloração das lâminulas foi realizada utilizando o corante SYTO 9 (Molecular Probes), em uma proporção de 3 μ L de corante para cada 1 mL de água. Em cada poço foi adicionado 250 μ L da solução com corante. A placa foi incubada por 15 minutos no escuro. As lâminulas foram retiradas dos poços e fixadas em lâminas utilizando o reagente ProLong® Gold antifade reagent (Life Technologies™) para proteger da luz e prolongar a vida do corante. Por fim, as lâminulas foram visualizadas por microscopia de fluorescência (Axioplan 2). Foram fotografados 20 campos aleatórios para análise no *software Image J* (NHI, EUA). Os experimentos foram realizados em duplicatas. A média de bactérias aderidas por campo foi quantificada utilizando o programa Graphpad Prisma 5 e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA (comparações múltiplas) com objetivo de comparar a quantidade de bactérias aderidas em concentrações diferentes.

4.3 Obtenção de extrato enriquecido de PMEs

Esse experimento foi realizado segundo Hobb e colaboradores (2009), com algumas modificações. As cepas foram cultivadas segundo a metodologia exemplificada no item 4.1. A partir desse cultivo, as colônias foram incubadas em 500 mL de caldo BHI, em câmara de anaerobiose, por 12 horas a 37 °C. Após a incubação, as culturas foram submetidas à centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 20 mL de tampão Hepes (10 mM, pH 7.4 - Sigma®) e Hepes com adição de sódio (10mM, pH 7.4 - Sigma®). As células no sedimento foram rompidas utilizando o sonicador Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor sonicator (NY, EUA) utilizando potência de 40 Watts em 44 ciclos por 40 segundos ou 10 ciclos de 90 segundos. A separação das células intactas e rompidas foi feita através de centrifugação a 4000 xg por 10 minutos. O sobrenadante contendo a fração do envelope foi submetido à ultracentrifugação (Beckman Coulter Inc., Califórnia, EUA) por 1 hora a 100.000 xg utilizando rotor SW40Ti. O sedimento resultante foi suspenso em 2 mL de tampão Hepes (10 mM, pH 7.4), e ajustado para um volume total de 10 mL de Hepes e submetido novamente a ultracentrifugação utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. Após 1 hora, o sedimento foi suspenso em 5 mL da solução de N-lauroilsarcosina a 1% (Sarkosyl, Sigma-Aldrich, EUA) em Hepes (10 mM, pH 7.4), e incubado a 37 °C por 30 minutos sob agitação. Durante essa etapa, o detergente N-lauroilsarcosina solubiliza as proteínas de membrana interna. As proteínas de membrana tratadas com N-lauroilsarcosina foram submetidas a mais uma centrifugação em ultracentrífuga, com as mesmas condições descritas inicialmente. No final dessa etapa de ultracentrifugação foi obtido um extrato enriquecido com PMEs. O sedimento foi lavado com 10 mL de hepes e submetido à centrifugação em ultracentrífuga, com as mesmas condições descritas inicialmente. Finalizada a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em 500 µL em Hepes, e 10 µL de Rapigest (0,2%) e armazenado a -20 °C.

4.4 Purificação do ligante específico através de coluna de cromatografia por afinidade

O extrato enriquecido de proteínas de membrana externa foi submetido a uma separação em coluna de afinidade com laminina imobilizada para purificação do ligante específico, laminina. Nesse experimento foi utilizado a coluna HiTrapTMNHS-activated HP (GE Healthcare Life Sciences) de sefarose ativada para o acoplamento de ligantes que contém grupos amino primários. Todas as soluções e tampões que foram utilizados foram preparados e filtrados, em fluxo laminar, pouco antes do experimento. A ativação da coluna e o acoplamento do ligante ocorrem paralelamente.

A primeira solução é o Tampão de Ligação ou *Coupling Buffer* (bicarbonato de sódio 0,2 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 8.3), sendo o tampão utilizado para diluir o ligante (laminina) à ser imobilizado na coluna. A concentração de laminina utilizada na coluna foi de 0,05 mg/mL segundo recomendação do fabricante. Antes da imobilização da proteína, a coluna foi ativada com três lavagens sucessivas com solução (gelada) de 2 mL de isopropanol-HCl (1 mM). Imediatamente após o tratamento, 1 mL do ligante diluído em *Coupling Buffer* na concentração de 0,05 mg/ml foi inserido na coluna e incubado por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a coluna foi lavada para que houvesse desativação de ligantes inespecíficos. Nessa etapa foram utilizados dois tampões: *Buffer A* (etanolamina 0,5 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 8.3) e *Buffer B* (acetato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 4.0). Primeiramente, foi realizada 3 injeções de 2 mL do *Buffer A*, em seguida 3 injeções de 2 mL do *Buffer B* e novamente 3 vezes 2 mL do *Buffer A*. A coluna foi novamente incubada por 4 horas a 4 °C. Após a incubação, foram realizadas mais 3 injeções de 2 mL do *Buffer B*, em seguida 3 injeções de 2 mL do *Buffer A*, depois 3 injeções de 2 mL do *Buffer B* e por fim 2 mL do *Binding buffer* (PBS-NaCl 0,5 M, pH 7,4) para ajustar o pH da coluna.

Após essas etapas, foram injetados 2 mL do extrato enriquecido de PME e mantidos por 4 horas a 4 °C. Após o tempo de interação, a coluna foi lavada com 3 mL do *Binding buffer* para retirar as proteínas que se ligaram inespecificamente. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 mL do *Elution buffer* (glicina 0,1 M, HCl, pH 3,0) para retirar a laminina e as proteínas que se ligaram especificamente a laminina. Todos os extratos que foram eluídos da coluna foram armazenados a -20°C.

Posteriormente, foram realizadas análise eletroforética e coloração das proteínas segundo os itens 4.6 e 4.7.

4.5 Concentração dos extratos proteicos

Logo após a purificação do ligante utilizando a coluna de afinidade, os extratos eluídos com o tampão *Elution buffer* foram submetidas a duas técnicas de concentração de proteínas, utilizando o sistema Amicon® (Merk) com poros de 3 KDa e através de secagem das amostras utilizando o aparelho Speed-vac, simultaneamente.

4.6 Análise eletroforética

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas segundo Laemmli, (1970) em sistema vertical e descontínuo, utilizando gel de empacotamento (4%) e gel de separação (10%) em tampão de corrida tris-glicina (tris 0,1 M, glicina 1 M e SDS 0,5%). Uma alíquota do extrato enriquecido de PMEs foi misturado ao tampão de amostra (tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,05%) na razão 1:2, fervidas por 10 minutos a 100 °C e submetidas a eletroforese a 30 mA/ 70 V para o gel de empacotamento e 30 mA/ 100 V para o gel de separação. Como controle da eletroforese foi utilizado um padrão de tamanho molecular de proteínas *Broad Range Protein Molecular Weight Marks* (Promega).

4.7 Coloração de Proteínas

Para visualização das proteínas foram utilizados dois tipos de coloração, utilizando nitrato de prata e azul de coomassie coloidal 250. A coloração de prata foi realizada segundo Ferreira e colaboradores, (2011). Para visualizar as proteínas, o gel

foi fixado por 30 minutos em uma solução de fixação (metanol 40%, ácido acético 10%). Em seguida o gel foi lavado 5 vezes com água destilada por 5 minutos cada. Após as lavagens, o gel foi colocado em uma solução de glutaraldeído (10%) por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 5 vezes com água destilada por 5 minutos cada. Antes da última lavagem, a solução de prata (hidróxido de sódio 0,36%, hidróxido de amônio 25% e nitrato de prata 19,4%) foi preparada e adicionada ao gel por 7 minutos. Logo após, o gel foi lavado 5 vezes com água destilada por 5 minutos cada. A solução de revelação (ácido acético 50% e formaldeído 35%) foi preparada e adicionada ao gel no término das lavagens até as bandas escurecerem. Para parar a reação provocada pela solução reveladora foi utilizada uma solução de ácido acético (5%). A coloração de prata é uma forma mais sensível e específica de visualizar proteínas em baixas concentrações que não seriam visualizadas utilizando colorações comuns, sendo capaz de detectar 0,1 µg de proteína.

A segunda coloração que foi utilizada é a de *Coomassie blue* G-250 coloidal adaptada de Neuhoff e colaboradores (1988). Para visualizar as proteínas, o gel foi fixado com uma solução fixadora (etanol 30% e ácido fosfórico 2%) por 1 hora, sob leve agitação. Depois foi adicionado ao gel uma solução de ácido fosfórico (2%) por 1 hora, sob leve agitação. Em seguida foi adicionado ao gel uma solução de ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%) por 30 minutos. Após 30 minutos foi adicionado a solução, 1% do volume referente da solução anterior, de uma solução de *Coomassie Blue* G-250 (Sigma) 20 g/L, sob leve agitação por 72 horas. Esse método é menos sensível, específico do que a coloração de prata, e é capaz de detectar a partir de 0,2 µg de proteínas.

4.8 Extração e digestão de proteínas separadas por SDS-PAGE

As bandas observadas no gel de SDS-PAGE foram recortadas utilizando uma placa de vidro tratada com metanol 100% e colocadas em tubos Axigen também tratados com metanol 100% para não haver contaminação por queratina. As bandas foram descoradas com 500 µL de acetonitrila 50% de bicarbonato de amônio 25 mM (na proporção de 1:1, pH 8) até ficarem completamente transparentes. As amostras

foram agitadas em vortex por 10 minutos a cada etapa e o volume adicionado posteriormente descartado. A solução de lavagem foi removida e as amostras secas em Speed-vac por 30 minutos. Foi adicionado nas amostras 100 μ L de ditioneitol (DTT) 10 mM, em solução de bicarbonato de amônio 25 mM, preparado no momento do uso. As mesmas foram mantidas a 56 °C na placa de aquecimento por 60 minutos. A solução de DTT foi removida e as bandas foram lavadas com 300 μ L de bicarbonato de amônio 25 mM, as amostras foram agitadas em vortex, em seguida o volume foi descartado. Foram adicionados 100 μ L de uma solução de iodoacetamida (IAA), 50 mM e bicarbonato de amônio 25 mM, preparada no mesmo dia, à temperatura ambiente, mantidas no escuro, por 30 minutos. A solução de IAA foi removida e as bandas lavadas com 200 μ L de bicarbonato de amônio 25 mM por três vezes, agitando as amostras em vortex e descartando posteriormente o volume adicionado. Foram adicionados 100 μ L de acetonitrila e agitado em vortex por 10 minutos. O gel foi desidratado no Speed-vac por 30 minutos. Uma solução de tripsina (PROMEGA GOLD) de 0,01 μ g/ μ L com bicarbonato de amônio 50 mM e 1 mM de CaCl₂, foi preparada e mantida em gelo a todo momento. Foram adicionados 10 μ L da solução de tripsina sobre o gel a fim de hidrata-lo com tal solução, mantendo-o no gelo por 10 minutos. Após esse período, os pedaços de gel foram cobertos com solução de bicarbonato de amônio 50 mM e 1 mM CaCl₂. A adição de tripsina foi realizada no gelo por 10 min. A digestão ocorreu por intervalos de tempo de 18 h a 37°C. Em seguida, a solução foi removida para um tubo novo de 600 μ L. A extração dos peptídeos foi realizada com 30 μ L de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila (na proporção de 1:1) utilizando um sonicador por 10 min. Os volumes da solução de peptídeos foram transferidos para microtubos de 600 μ L. O procedimento foi realizado duas vezes. Os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 16.000 xg. As amostras foram secas no Speed-vac e guardadas a -20°C para análise posterior.

4.9 Digestão de proteínas *in solution*

O protocolo de digestão escolhido tem como base a utilização do surfactante Rapigest e de incubações utilizando o termociclador. Inicialmente foram adicionados 5 µg de proteína em um tubo de PCR anteriormente lavado com metanol 100%. Em seguida, é adicionado 10 µL de 0,2% de Rapigest, diluído utilizando 500 µL de tripsina em um frasco para preparar a solução de 0,2% de Rapigest, na amostra. A mesma é incubada a 99 °C por 5 minutos no termociclador, em seguida a temperatura é reduzida para 4 °C. Logo em seguida, foi adicionado 5 µL de uma solução de tripsina (Promega), preparada utilizando 50 mM de AMBIC (NH₄HCO₃) e 1 mM de CaCl₂ com pH 10, e a amostra foi incubada no termociclador por 5 ciclos de 52°C a 30 minutos cada, mais 2 ciclos de 37 °C-4 °C a 60 minutos cada. Após os ciclos, é adicionado 5 µL de HCl 1,2 M, para quebrar a ação da tripsina. Em seguida, a amostra é incubada a 37°C por 30 minutos. Para remoção de debris celular foi realizada uma centrifugação por 5 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e levado ao Speed-vac para secagem. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C para análise por espectrometria de massas.

4.10 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

A solução de peptídeos digerida foi suspensa em 20 µL de 0,1% de ácido fórmico para análise por LC-MS (cromatografia líquida com espectrômetro de massa). Para análise e identificação das proteínas foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) Nexera X2, Shimadzu acoplado ao espectrômetro. A coluna utilizada foi o modelo Acquity CHS C18, 1.0 x 150 milímetros, 1.7 µm de diâmetro de partícula. A corrida foi realizada em gradiente com fase móvel A 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água e fase B em acetonitrila.

O espectrômetro que foi utilizado é o Impact HD, configuração ESI-Q-TOF (Bruker™). A polaridade utilizada foi modo positivo e para aquisição dos espectros de

precursores e fragmentos de peptídeos foi utilizada a aquisição dependente de dados (DDA ou AutoMS).

4.11 Bioinformática

As análises dos espectros de massa em *tandem* gerados pelo ESI-Q-TOF a partir das bandas do gel, foram realizadas utilizando o programa Mascot Distiller (Matrix Science, versão 2.2.1.0). As busca pelas sequências homólogas de proteínas foram realizadas utilizando o programa Mascot *online*. Foi utilizado como base, o banco de dados SwissProt e NCBIInr, com tolerância de 0,1 DA para cada íon fragmento, cargas de cada peptídeo (+2 e +3), com modificações globais Carbamidometil (C) e modificações variáveis Oxidação (M) foram considerados.

Em relação as análises dos espectros de massa em *tandem* gerados pelo ESI-Q-TOF a partir das digestão *in solution* também foram realizadas utilizando o programa Mascot Distiller (Matrix Science, versão 2.2.1.0). A busca pelas sequencias também foram realizadas utilizando o programa Mascot *online*. Os bancos de dados utilizados como base foram os mesmos, assim como a tolerância de 0,1 DA para cada íon fragmentado, as cargas dos peptídeos foram de +2, +3 e +4 e apenas modificações variáveis de Oxidação (M) foram consideradas.

Todos os peptídeos foram submetidos ao programa Cello e Psort para confirmação da origem celular das proteínas.

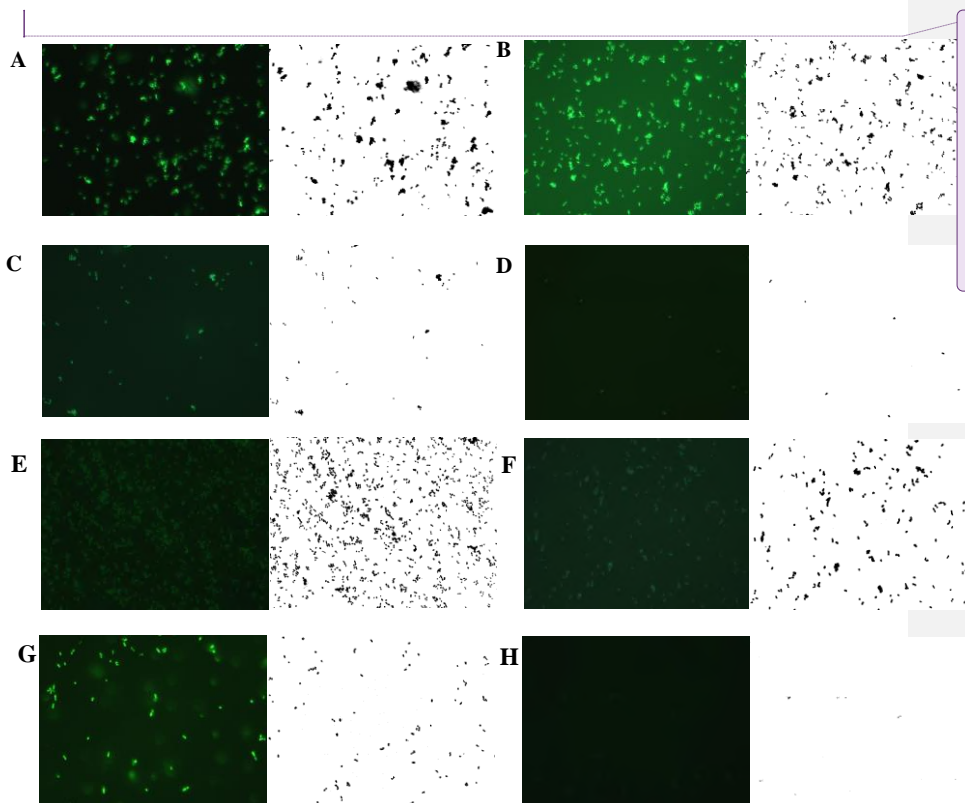
5. RESULTADOS

5.1 Quantificação da adesão de cepas de *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*

Para analisar a adesão em espécies de *Prevotella spp*, foram utilizadas três espécies, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*, descritas no item 4.1. Dentre as espécies testadas, apenas duas espécies, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*, demonstraram capacidade de adesão as diferentes concentrações de laminina utilizada nos experimentos. Para *P. nigrescens*, a média obtida foi de 317,4 Bac/CV (bactérias por campo contado) na concentração de 10^8 UFC/mL (**Figura 5 A**), 316,6 Bac/CV na concentração de $5 \cdot 10^7$ CFU/mL (**Figura 5 B**), 155,4 Bac/CV na concentração de 10^7 UFC/mL (**Figura 5 C**), e a adesão ao controle negativo (BSA) foi de 98,1 Bac/CV na concentração de 10^8 UFC/mL (**Figura 5 D**), no primeiro experimento. No segundo experimento com 2 horas de incubação, com *P. nigrescens*, a média obtida foi de 1458,1 Bac/CV na concentração de 10^8 CFU/mL (**Figura 5 E**), 1390,82 Bac/CV na concentração de $5 \cdot 10^7$ CFU/mL (**Figura 5 F**), 430,455 Bac/CV na concentração de 10^7 UFC/mL (**Figura 5 G**) e a adesão no controle negativo (BSA) 427,364 Bac/mL na concentração de 10^8 UFC/mL (**Figura 5 H**).

Comentado [R1]: eu acho legal destacar e negrito mas no manual está assim?

é a 5 mesmo? contando as da introdução e de materiais e métodos? que coisa



Comentado [R2]: é mundialmente aceito qur vc comece pela letra A.....

ah e vc deve indicar como as imagens foram mostradas pq tem duas imagens pra cada letra. então vc precisa dizer que a de fundo preto é tal e de fundo branco é a mesma imagem alterada por tal software só pra facilitar a visualização ou outro motivo igualmente nobre. Acho que essa parte cabe na legenda.

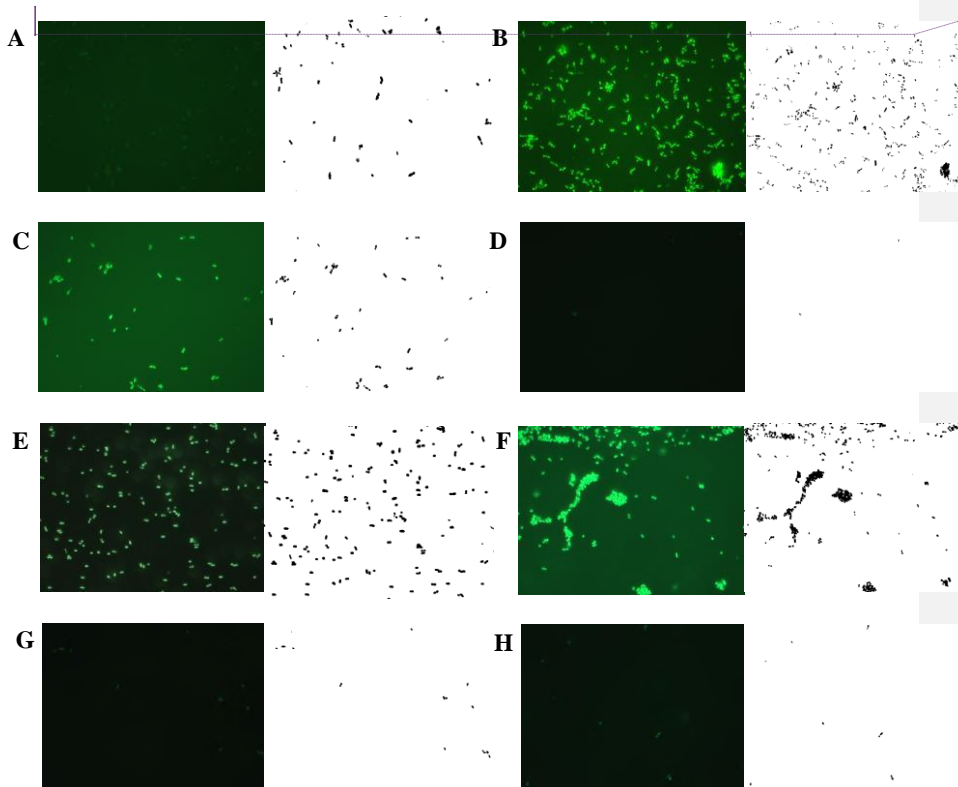
a não ser que leandro queira colocar letra pra essas com fundo branco. eu não acho necessário

Figura 5: Adesão de *P. nigrescens* à laminina. Para a primeira replicata: Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (A). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 5×10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (B). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (C). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (D). Para a segunda replicata: Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (E). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 5×10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (F). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (G). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (H).

Em *P. melaninogenica*, a média de adesão obtida foi de 287,5 Bac/CV na concentração de 10^8 UFC/mL (**Figura 6 A**), 599,5 Bac/CV na concentração de 5×10^7 UFC/mL (**Figura 6 B**), 141 Bac/CV na concentração de 10^7 UFC/mL (**Figura 6 C**) e a adesão no controle negativo (BSA) foi de 38 Bac/CV na concentração de 10^8 UFC/mL (BSA) (**Figura 6 D**), no primeiro experimento. No segundo experimento, *P.*

Comentado [R3]: se com todas as alterações anteriores essa imagem ficar separada tem q deixar elas juntas

melaninogenica, a média obtida foi de 410,6 Bac/CV na concentração de 10^8 UFC/mL (**Figura 6 E**), 144,2 Bac/CV na concentração de 5×10^7 UFC/mL (**Figura 6 F**), 28,3 Bac/mL na concentração de 10^7 UFC/mL (**Figura 6 G**), 22,45 Bac/CV na concentração de 10^8 UFC/mL (BSA).



Comentado [R4]: olha lá a letra A começando.... dá pra fazer na outra tb

Figura 6: Adesão de *P. melaninogenica* à laminina. A adesão foi quantificada através do programa Image J utilizando a análise de partículas. Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (A). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 5×10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (B). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (C). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL (BSA), segunda imagem alterada com o software Image J (D). Para a segunda replicata: Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (E). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 5×10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (F). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^7 UFC/mL, segunda imagem alterada com o software Image J (G). Microscopia de fluorescência com aumento de 100x na concentração de 10^8 UFC/mL (BSA), segunda imagem alterada com o software Image J (H).

Além das análises por microscopia de fluorescência, as médias obtidas a partir da contagem de bactérias foram submetidas ao programa *Graphpad Prism 5* para produção dos gráficos e análises estatísticas, utilizando o teste t de Student (Figuras 7, 8, 9 e 10). Para a espécie *P. nigrescens* não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de adesão a laminina, nas concentrações de 10^8 UFC/mL e 5×10^7 UFC/mL ($P = 0,98$) e houve diferença na adesão à laminina 10^7 UFC/mL e no controle negativo BSA 10^8 UFC/mL ($P = 0,03$). Também, houve diferença significativa na adesão à laminina entre 5×10^7 UFC/mL e 10^7 UFC/mL ($P = 0,0001$), e entre 5×10^7 UFC/mL e no controle negativo BSA 10^8 UFC/mL ($P = 0,0001$) (Figura 7). O mesmo pode ser observado nos gráficos da espécie *P. melaninogenica* (Figura 8). Na Figura 9 não houve diferença significativa apenas entre 10^8 UFC/mL e 5×10^7 UFC/mL ($p = 0,89$) de *P. nigrescens*. E na Figura 10 houve diferença significativa entre as três concentrações. A adesão do controle negativo na segunda replicata de *P. melaninogenica* não teve diferença significativa em relação a concentração de 10^7 UFC/mL ($p = 0,4$).

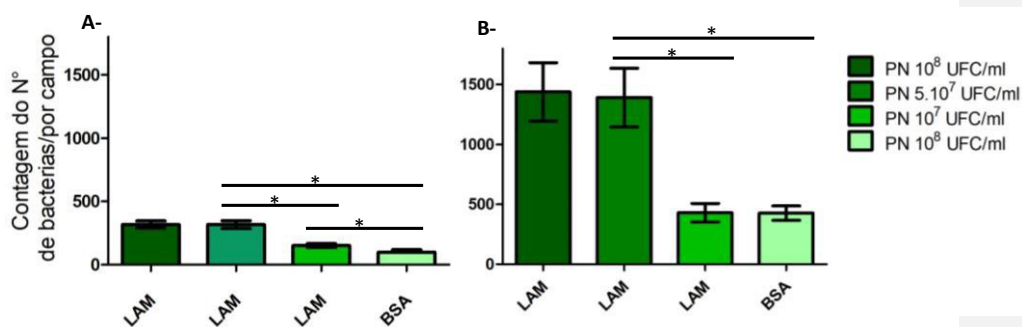


Figura 7: Quantificação de *P. nigrescens* aderidas por campo visual. A contagem de bactérias foi realizada através do software *Image j* que contabiliza as partículas na imagem e gera um número de bactérias aderidas por foto. Cada contagem é adicionada no programa *Graphpad Prism 5* que gera uma média da aderência e também realiza as análises estatísticas pelo Test T. Os resultados obtidos são da primeira réplica biológica. Os asteriscos (*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ($p < 0,05$). **A-** Primeiro experimento com incubação de 1 hora em anaerobiose. **B-** Segundo experimento com incubação de 2 horas em anaerobiose.

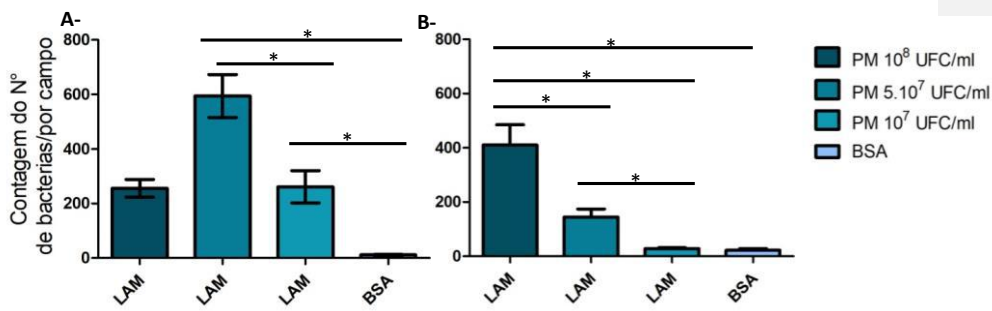


Figura 8: Quantificação de *P. melaninogenica* aderidas por campo visual. A contagem de bactérias foi realizada através do *software Image j* que contabiliza as partículas na imagem e gera um número de bactérias aderidas por foto. Cada contagem é adicionada no programa *Graphpad Prism 5* que gera uma média da aderência e também realiza as análises estatísticas pelo Test T. Os resultados obtidos são de apenas da primeira réplica biológica. Os asteriscos (*) indicam quais amostras quando comparadas entre si, apresentam uma diferença significativa ($p < 0,05$). **A-** Primeiro experimento com incubação de 1 hora em anaerobiose. **B-** Segundo experimento com incubação de 1 hora em anaerobiose.

5.2 Obtenção de extrato enriquecido de PMEs e análise eletroforética

Para obtenção de extratos enriquecidos de PMEs, foram utilizadas as três espécies: *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*. Utilizando duas colorações, nitrato de prata e coomassie G, podemos observar que a extração foi bem sucedida, com diferentes perfis proteicos em cada cepa testada. Também foram utilizados diferentes parâmetros de sonicação, para garantir uma lise celular mais eficiente. Como observado, no gel a sonicação de 44 ciclos de 40 segundos demonstrou um perfil proteico mais diverso, quando comparado com a sonicação de 10 ciclos de 90 segundos, porém o protocolo escolhido para ser seguido foi o de 10 ciclos por 90 segundos, para reduzir o risco de degradação das proteínas (**Figura 9 A e B**).

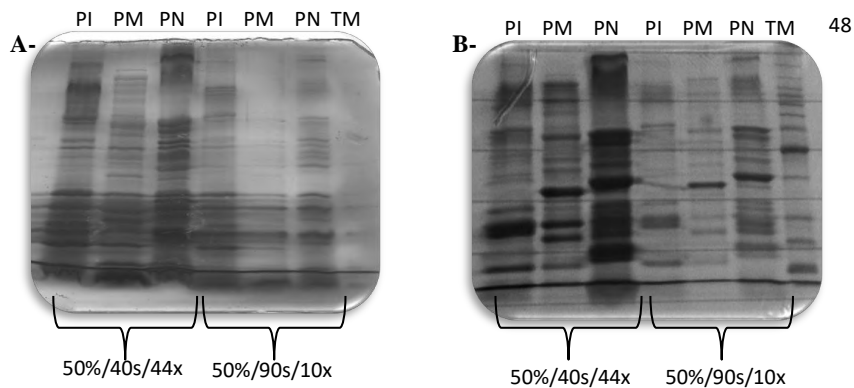


Figura 9: Extração de PMEs de *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*. (A) Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata com 50%/40s/44x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos) no 1° experimento e no 2° experimento 50%/90s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos). (B) Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie coloidal G-250 com 50%/40s/44x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos) no 1° experimento e no 2° experimento 50%/90s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos). As siglas PI, PM, PN e TM, correspondem a *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* e ao padrão de tamanho ou massa molecular, respectivamente.

Outra extração de PMEs utilizando tampão HEPES com adição de sódio foi realizada, onde as células foram submetidas a sonicação por 10 ciclos de 90 segundos e coloração com nitrato de prata, e demonstrou um perfil proteico diferente do encontrado nas extrações anteriores utilizando o tampão HEPES puro (**Figura 10**). A banda de PN1 corresponde a extração de PME utilizando o tampão HEPES puro, que foi utilizado nas extrações anteriores e PN2 é a extração realizada com HEPES com adição de sódio. Considerando esses resultados, passamos a utilizar apenas o tampão HEPES puro para posterior extrações.

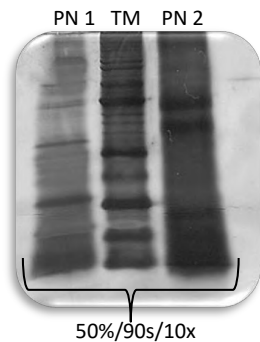


Figura 10: Extração de PMEs de *P. nigrescens* utilizando diferentes HEPES. Gel de poliacrilamida corado com prata com 50%/90s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos). PN 1 corresponde a extração de PME utilizando HEPES puro, o mesmo utilizado na extração anterior, TM corresponde ao padrão de peso molecular e PN 2 corresponde a extração de PME utilizando HEPES com adição de Na.

Por fim, o protocolo padronizado para extração de PME leva uma sonicação com 50%/90s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos) e HEPES puro, sem a adição de sal.

5.3 Purificação do ligante específico através de cromatografia de afinidade e análise eletroforética

Após a extração de PMEs, foi realizada uma purificação por uma coluna de cromatografia de afinidade para purificação das proteínas que se ligam especificamente à laminina. Todas as lavagens realizadas durante os experimentos foram armazenadas para posterior análise eletroforética. Com relação à *P. nigrescens*, na **Figura 11**, as bandas de eluição do ligante específico (utilizando glicina-HCl) foram muito fracas, mesmo após a concentração das proteínas, porém, ainda é possível observar bandas (sinalizadas com setas) de diferentes tamanhos utilizando a coloração de azul de Coomassie coloidal 250 e prata. As bandas presentes no gel de azul de Coomassie coloidal 250 foram cortadas e enviadas para espectrometria de massas para análise. Em seguida, concentramos o extrato utilizando o aparelho Speed vac. O extrato de proteínas que foi passado na coluna é proveniente de outra extração de PME, utilizando os parâmetros já definidos. A amostra de eluição dessa coluna foi enviada em solução para espectrometria de massas para análise (**Figura 11 C**).

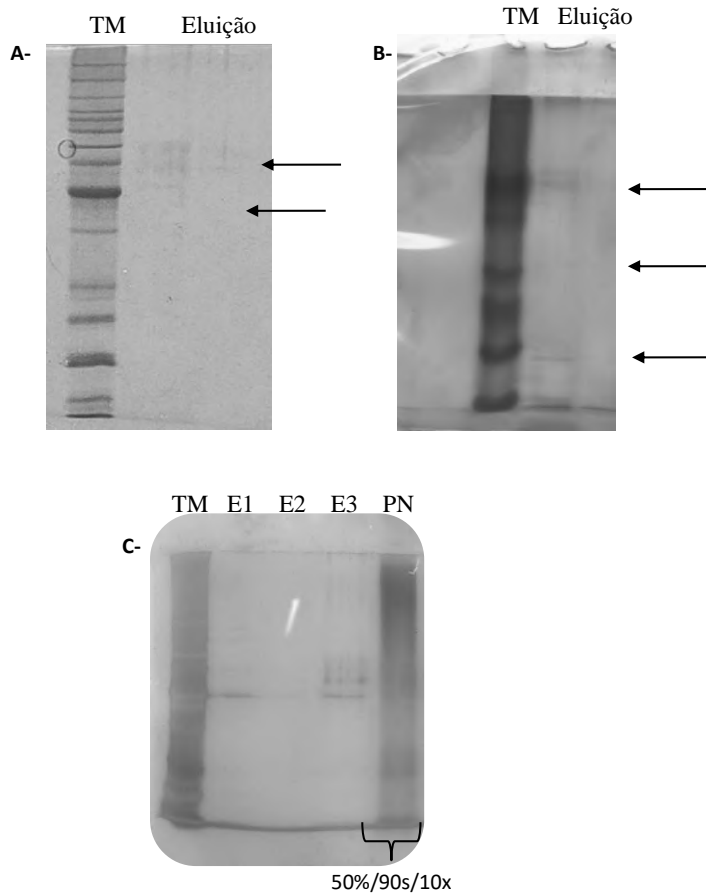


Figura 11: Purificação do ligante de *P. nigrescens* após concentração. Gel de poliacrilamida corado com comassie G (A). Gel de poliacrilamida corado com prata (B). A primeira banda TM corresponde ao padrão de peso molecular. As outras duas bandas representam a eluição de proteínas de *P. nigrescens*, que se ligaram especificamente a laminina e que foram concentradas utilizando o filtro Amicon® Ultra Centrifugal Filters (A e B). Gel de poliacrilamida corado com prata com 50%/90s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos). A primeira banda TM corresponde ao padrão de peso molecular. As bandas E1, E2 e E3, representam a eluição de proteínas de *P. nigrescens*, que se ligaram especificamente a laminina. E PN representa a extração de PME de *P. nigrescens* (C).

Outra coluna utilizando a espécie *P. intermedia* foi realizada e não houve a presença de proteínas eluídas no gel corado com comassie G (**Figura 10**).

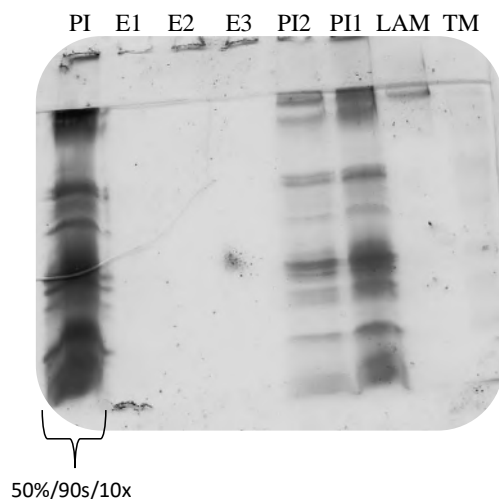


Figura 12: Extração de PME's de *P. intermedia* utilizando quantidades maiores de meio de cultura e purificação do ligante. Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie coloidal 250 com 50%/10s/10x (amplitude/tempo de sonicação/ n° de ciclos). PI corresponde à extração de PME utilizando dois litros de meio de cultura (BHI) da espécie *P.intermedia*, as bandas E1, E2 e E3 correspondem à eluição de ligantes que se ligam especificamente a laminina, eluídas utilizando glicina-HCl. PI 1 corresponde ao extrato proteico que passou pela coluna, mas não se ligou especificamente. Já a banda PI 2 equivale ao lavado de proteínas que não se ligou a laminina. A banda de LAM representa a laminina não adsorvia na coluna e a banda TM é o padrão de peso molecular.

5.4 Proteômica

Primeiramente, as bandas do gel da **Figura 11 A**, foram enviadas para análise no aparelho ESI-Q-TOF no Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas. Cada banda foi nomeada como C1, D1, D2, E1, E2 e E3. Todos os resultados foram analisados utilizando o programa Mascot online, com parâmetros já descritos no item 4.11. Os resultados iniciais demonstraram uma alta contaminação por queratina nas amostras. Porém, alguns peptídeos ainda foram identificados e submetidos a uma busca

no banco de dados do NCBI, para busca de proteínas com alguma identidade na cepa de *P. nigrescens* utilizada nos experimentos.

As análises da banda C1, em relação ao peptídeo **SLDLDSIIAEVK** foi demonstrado a presença de uma adesina, com 83% de cobertura e 83% de identidade. No mesmo peptídeo foi encontrada também homologia com uma proteína hipotética HMPREF9419_1933, que através de análises no Blast, demonstrou ser a mesma sequência da adesina encontrada. O mesmo peptídeo encontrado em C1 foi encontrado nas análises das bandas E1, E2 e E3 sendo identificada a mesma adesina (**Tabela 2**). Na banda E3, o peptídeo **FASFIDKVR** também foi encontrado com homologia na mesma adesina e a mesma proteína hipotética, com uma cobertura de 77% e uma identidade de 100%.

Analisando outros peptídeos e outras bandas, foram encontradas diversas homologias com diferentes proteínas. A banda D1 não demonstrou presença de nenhum peptídeo. Os resultados completos de espectrometria de massas estão demonstrados na tabela em anexo.

Na digestão *in solution*, houve uma contaminação de outra amostra com proteínas de *E. coli* e *Salmonella*. Porém, alguns peptídeos foram identificados e também submetidos a busca no banco de dados do NCBI para busca de homologia com proteínas da cepa de *P. nigrescens* utilizada nos experimentos. As análises do peptídeo **ALVDAGYDGIVSAGVGDGNLYK** demonstraram a presença da mesma adesina encontrada na digestão das bandas, com uma cobertura de 68% e identidade de 100%, a proteína hipotética HMPREF9419_1933 também foi encontrada com cobertura de 68% e identidade de 100% (**Tabela 3**). Outras proteínas também foram encontradas e estão demonstradas na tabela 4 e 5 em anexo.

Esses resultados demonstraram, que essa proteína tem identidade de 100% com a proteína hipotética HMPREF9419_1933 específica de *P. nigrescens* cepa 33563. Esse programa também demonstrou que dentro da família Prevotellaceae 236 espécies possuem proteínas com homologia a adesina.

Tabela 2: Proteínas ligantes a laminina de *P. nigrescens* identificadas a partir das bandas cortadas do gel contendo eluição com glicina-HCl

Número	Possível localização ¹	Número de Acesso ²	Identificação	Score ³	Massa (DA) ⁴	Peptídeos Representativos	Banda
1	ME	WP_040557291.1	adhesin [Prevotella nigrescens]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
2	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
3	ME	WP_040557291.1	adhesin [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
4	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
5	ME	WP_040557291.1	adhesin [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
6	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2

7	ME	WP_040557291.1	adhesin [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
8	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
9	ME	WP_040557291.1	adhesin [Prevotella nigrescens]	65	1301.7078	FASFIDKVR	E3
10	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	65	1301.7078	FASFIDKVR	E3

Os peptídeos identificados foram submetidos a protocolos de digestão em gel e *in solution* e analisados por ESI-Q-TOF, como descrito nos materiais e métodos.

¹CELLO e Psort. ME: Membrana Externa; MI: Membrana interna; EC: Extracelular; PE: Periplasma; CT: Citoplasma

²Número de identificação da proteína no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

³Valor considerado para identificação eficiente dado pelo programa *Mascot*.

⁴Massa Molecular (*Mascot*)

Tabela 3: Proteínas ligantes a laminina de *P. nigrescens* identificadas a partir da digestão in solution da eluição com glicina-HCl.

Número	Possível localização ¹	Número de Acesso ²	Identificação	Score ³	Massa (DA) ⁴	Peptídeos Representativos
			adhesin [<i>Prevotella nigrescens</i>]			
2	ME	EGQ12054.1	hypothetical protein HMPREF9419_1933 [<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG

Os peptídeos identificados foram submetidos a protocolos de digestão em gel e *in solution* e analisados por ESI-Q-TOF, como descrito nos materiais e métodos.

¹CELLO e Psort. ME: Membrana Externa; MI: Membrana interna; EC: Extracelular; PE: Periplasma; CT: Citoplasma

²Número de identificação da proteína no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

³Valor considerado para identificação eficiente dado pelo programa *Mascot*.

⁴Massa Molecular (*Mascot*)

6. DISCUSSÃO

Um dos passos essenciais da patogênese bacteriana é a adesão. O processo de adesão fornece à bactéria estabilidade, proteção, permanência e colonização de um microrganismo em determinada superfície. Diversas bactérias possuem a habilidade de se aderir à superfícies bióticas e abióticas, como *Staphylococcus aureus* (Yang e Ji, 2014), *Streptococcus pyogenes* (Brouwer *et al.*, 2016), *Neisseria gonorrhoeae* (Tramont, 1981), *E. coli* (Friedlander, Vogel e Aizenberg, 2015), entre diversas outras. A adesão pode ocorrer em diferentes sítios do corpo, e podem ter como alvo proteínas, carboidratos, lipídeos e açúcares (Ofeck, Hasty e Doyle, 2003). A adesão pode ser definida também como um passo importante para que bactérias consigam invadir e se disseminarem pelos tecidos do hospedeiro. Para isso, elas precisam de mecanismos de adesão a componentes da MEC, que vem a ser uma barreira de sustentação para as células epiteliais e proteção do endotélio.

Estudos em relação à adesão de bactérias anaeróbias são muito escassos, bem como estudos sobre a patogenicidade de espécies de *Prevotella spp.* Levando isso em consideração, nosso grupo analisou três espécies de *Prevotella*, comumente encontradas na cavidade oral quanto à sua capacidade de adesão a proteínas da MEC. Das três espécies selecionadas, apenas duas, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*, demonstraram um potencial de adesão em diferentes concentrações de inóculo bacteriano.

P. melaninogenica exibiu um potencial de adesão maior durante os ensaios, e até o momento não existem muitos trabalhos relacionando essa espécie à adesão a MEC e nem demonstrando a associação de *P. melaninogenica* a outras espécies. Essa espécie já foi isolada no escarro de crianças com fibrose cística (Tunney *et al.*, 2008), e em pacientes com quadros avançados de periodontite (Triches *et al.*, 2014). Nesse contexto, alguns estudos demonstram sua presença em infecções em outros sítios, não tão comuns a sua colonização, como a presença de anticorpos de *P. melaninogenica* em pacientes com artrite reumatoide (Ogrendik *et al.*, 2005), isolamento dessa espécie em pacientes com inflamação na região pélvica (Saini *et al.*, 2003) e também em pacientes com osteomielite (Finkelstein *et al.*, 1992).

A adesão de *P. nigrescens* foi menor, quando comparada a *P. melaninogenica*. Essa espécie, diferente de *P. melaninogenica*, está muito mais relacionada a doenças na cavidade oral, como quadros de periodontite crônica e agressiva (Mullally *et al.*, 2000), aumento no risco de periodontite (Stingu *et al.*, 2013) e associação a periodontite crônica (Teapaisan, Douglas e Walsh, 1995). Também está ligada a quadros sistêmicos, como detecção de *P. nigrescens* em pacientes com aneurisma da aorta (Ding *et al.*, 2014), e alta prevalência com em indivíduos com doenças coronarianas (Beck *et al.*, 2005). Possui uma grande variedade de mecanismos de virulência. Porém, assim como *P. melaninogenica*, existem poucos estudos sobre adesão de *P. nigrescens*, e em relação a adesão da espécie a MEC, Alugupalli e Kalfas, em 1997, descreveram a adesão de *P. intermedia* e *P. nigrescens* a Matrigel.

No nosso estudo, analisando as duas espécies testadas, foi possível observar uma diferença significativa entre as concentrações utilizadas de 5.10^7 CFU/mL e 10^7 CFU/mL. Porém, há uma diferença bem marcante na quantidade de bactérias aderidas por campo entre *P. nigrescens* e *P. melaninogenica*. Outro dado importante é a diferença na concentração de bactérias aderidas entre o primeiro e o segundo experimento. Isso pode ter ocorrido, devido ao aumento no tempo de incubação com a laminina. Também em *P. nigrescens* foi observada uma adesão maior no controle negativo no segundo experimento, e isso pode ter se dado por conta da concentração do inóculo utilizada. Essa concentração de 10^8 CFU/mL para o controle negativo, foi escolhida como uma forma de reduzir o desperdício de laminina e BSA, utilizando altas concentrações de inóculo bacteriano. Ao observar também o primeiro experimento, entre a concentração de 10^8 CFU/mL e 5×10^7 CFU/mL não há diferença significativa entre as duas quantificações de adesão, uma das hipóteses para explicar esse fato, é que a partir de uma determinada concentração, há uma saturação da adesão bacteriana. Em *P. melaninogenica*, houve uma redução de bactérias aderidas por campo entre a concentração de 5×10^7 CFU/mL no primeiro experimento e na concentração de 5.10^7 CFU/mL no segundo experimento. A redução da adesão pode ter se dado por conta de alguns fatores, como mudança dos gases na câmara de anaerobiose, diferentes fabricantes dos reagentes para o preparo do meio de cultivo. Nossos resultados indicam que esses experimentos *in vitro* são bastante susceptíveis as mais diferentes variáveis, sendo de difícil reprodutibilidade. Entretanto, a tendência observada nos gráficos dos dois experimentos, como a dependência do tamanho do inóculo e a adesão negativa ao

controle (BSA), foi mantida. Dessa forma, julgamos que o método utilizado é confiável, mas depende de uma padronização estrita para reprodutibilidade.

A última espécie testada foi *P. intermedia* que não demonstrou adesão em nenhuma das concentrações testadas. Esse resultado foi inesperado, uma vez que essa é uma das únicas espécies do gênero que possui uma grande quantidade de estudos que demonstra sua capacidade de adesão a MEC. Em 1992, foi identificado que a cepa OMGS105 consegue se aderir à laminina (Kalfas *et al.*, 1992). Também já foi identificada aderência de *P. intermedia* e *P. nigrescens* a Matrigel e a inibição dessa adesão pode ser visualizada utilizando um tratamento com lactoferrina (Alugupalli & Kalfas, 1997). Yu e colaboradores em 2006, identificaram a AdpB na cepa *P. intermedia* 17, uma proteína de membrana externa que consegue se ligar a fibronectina, laminina, fibrinogênio e colágeno (Yu *et al.*, 2006). Com todos esses dados, acreditamos que a espécie de *P. intermedia* demonstraria uma adesão forte e dose dependente. Em função dos resultados obtidos, especulamos que possa ter ocorrido uma menor expressão de proteínas de membrana externa com função de adesina em razão da fase de crescimento utilizada nos experimentos. Além disso, não foi possível verificar a presença do gene codificando a proteína AdpB, já que a cepa utilizada em nosso estudo não foi sequenciada. Iniciadores serão desenhados para detecção do gene que expressa a proteína AdpB na cepa utilizada no estudo.

Durante os experimentos de adesão as concentrações bacterianas tanto de *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*, utilizadas foram de 10^8 UFC/mL, 5×10^7 UFC/mL e 10^7 UFC/mL. Nossos resultados demonstraram que a quantidade de bactérias aderidas na concentração de 10^8 UFC/mL não é significativamente maior em relação a concentração de $5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Acredita-se que isso possa se dar pela alta concentração de bactérias, que quando desafiadas a interagir com a laminina, formem grumos ou até mesmo não consigam se aderir de forma tão eficaz, uma vez que a lamínula possa estar saturada de bactérias. A formação de grumos também dificulta a leitura dos resultados que é feita de forma automatizada pelo programa imageJ. Observando a concentração de 5×10^7 UFC/mL é possível visualizar uma adesão mais uniforme e a formação de um tapete de bactérias, sem a presença de muitos grumos. Logo essa concentração se demonstrou ótima para experimentos de adesão utilizando essas espécies de *Prevotella spp.* Na concentração de 10^7 UFC/mL é visível uma redução da adesão, quando comparada com 5×10^7 UFC/mL, esse resultado é

significativo ($p < 0,05$), sugerindo que a adesão é dose dependente. Nosso controle negativo foi feito com BSA e a concentração de bactérias utilizada foi de 10^8 UFC/mL, o que gerou certo problema, por ser uma concentração muito alta, e essa bactéria ser capaz de se aderir também à lamínula, mesmo com bloqueio, foi possível detectar certa quantidade de bactérias aderidas bem próximo da quantidade de bactérias aderidas na concentração de 10^7 UFC/mL. Dessa forma, os próximos experimentos de quantificação da adesão serão realizados com uma concentração menor de bactérias no controle negativo.

Levando em consideração os resultados dos experimentos de adesão, na tentativa de elucidar o ligante da laminina, foi obtido um extrato enriquecido de PMEs. A adesão proteína-proteína é muito comum e já foi descrita em diversas espécies. Essas PMEs podem ter diversas funções, como adesão (Dyer *et al.*, 2015), proteção (Wu *et al.*, 2013), resistência (Li *et al.*, 2015) e também podem ser importante em usos terapêuticos, como produção de vacinas (Lun *et al.*, 2014). A metodologia de Hobb e colaboradores 2009 foi selecionada uma vez que seus resultados demonstravam uma extração de proteínas com bandas fortes, bem definidas e a solubilização das proteínas.

No presente estudo, o perfil de proteínas extraídas e visualizadas no gel foi diferente para cada espécie testada, as bandas visualizadas não estavam tão nítidas e foi possível observar a presença de bandas presas no gel de empacotamento. Em função desses resultados foram realizadas modificações no protocolo para aperfeiçoamento da técnica como utilização de sonificador com intuito de lisar as células e a adição de Rapigest ao final do protocolo para melhor solubilização de proteínas. Uma das desvantagens da técnica é a possível contaminação por proteínas de outros compartimentos celulares. Dessa forma, os dados obtidos da espectrometria de massas após a cromatografia foram submetidos às plataformas CELLO (Yu, Lin e Hwang, 2004) e PSORT para certificar que o possível ligante de laminina seja de fato uma PME.

Dentre as alterações metodológicas testadas, um ponto importante foi a etapa de sonicação. Inicialmente foi utilizada a frequência de 50 Hz e 44 ciclos de 40 segundos, a segunda sonicação utilizou a mesma frequência, mas foram modificados o número de ciclos e o tempo, para 10 ciclos de 90 segundos. A tentativa de diminuir o número de ciclos se deu por conta de que a sonicação pode vir a danificar as proteínas

de membrana dessas bactérias. As extrações com o primeiro protocolo, entretanto, se demonstraram mais eficazes em relação à diversidade de bandas observadas por SDS-PAGE. O uso de Hepes com sódio não trouxe resultados bem sucedidos, como visualizado na **Figura 9**, provavelmente a presença de sódio interferiu na extração das proteínas ou no detergente utilizado para solubilizar a membrana externa. A utilização do detergente N-lauroilsarcosina com concentração de 1% a 37 °C por 30 minutos demonstrou uma capacidade de solubilização maior, quando comparada com a concentração de 0,3% a 4 °C por 1 hora, utilizada por Boente *et al* (2016). A adição de Rapigest a 0,2% na etapa final da extração se deu por conta da hidrofobicidade dessas proteínas de PME que facilitava a formação de grumos a partir da suspensão do extrato apenas em tampão HEPES. Outros detergentes podem ser utilizados para solubilizar essas proteínas, como SDS 8.2 mM, Tween 20 0,05 mM, Triton X-100 0.3 mM (Vuckovic *et al.*, 2013). O uso do solvente vai depender do tipo de proteína e da metodologia de extração e purificação (Vuckovic *et al.*, 2013).

Mesmo com essas técnicas de solubilização, a visualização de PME no gel ainda é difícil, sendo possível observar distorções, como arrastes e proteínas presas no gel de empacotamento, sendo visível nas **Figuras 9, 10 e 11**. As metodologias de identificação de proteínas por gel podem ser problemáticas, uma vez que proteínas muito hidrofóbicas ou muito básicas, proteínas pouco concentradas, ou que possuem um peso molecular muito baixo ou muito alto, podem não ser bem visualizadas e perdidas nessa técnica. Com isso, outras técnicas de análise de proteínas de membrana, como a espectrometria de massas, podem ser estudadas e aplicadas dependendo do tipo de estudo de proteínas (Wu e Yates, 2003).

Utilizando as PMEs extraídas, realizamos uma cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrapTMNHS-activated HP de sefarose. Nossa análise de eficiência de ligação de laminina à coluna foi submetida à eletroforese todos os eluídos em um gel de poliacrilamida. Além disso, analisamos todos os efluentes da lavagem da coluna com tampão de lavagem permitiu a saída de PMEs não específicas do sistema e se é possível observar a presença de proteínas na eluição de laminina mais a proteína específica. Essa metodologia demonstrou visualmente no gel de SDS-PAGE, uma redução das bandas de proteínas após serem injetadas na coluna, quando comparada com o extrato proteico antes de ser injetado. Uma forma de analisar o rendimento da coluna seria quantificar a

concentração de proteínas, através do Qubit® (Invitrogen) a concentração de proteínas antes e depois de passar pela coluna, sendo essa uma forma prática e rápida de análise.

Analisando os géis de purificação de proteína nas **Figuras 11**, é possível observar a presença de bandas de proteínas nas porções de eluição do ligante específico da coluna. A detecção dessas proteínas só foi possível após metodologias de concentração. Inicialmente, foi utilizado o estudo de Fic e colaboradores em 2010, para selecionar metodologias de precipitação de proteínas. Com base nos resultados do artigo, selecionamos duas metodologias de concentração, utilizando clorofórmio/metanol e acetona. Entretanto, nenhuma das duas metodologias se mostrou eficiente para precipitação de proteínas de *Prevotella* spp. Posteriormente, selecionamos uma metodologia de concentração por centrifugação utilizando o sistema Amicon® de 4 mL com membrana de ponto de corte de 3 KDa, dessa forma, após a centrifugação, as proteínas eluídas da coluna ficam retidas pela membrana. Essa metodologia não é indicada, uma vez que há uma perda muito grande de material que pode ficar preso na membrana. Em adição, realizamos a secagem da amostra utilizando o equipamento Speed-Vac para obter um extrato ainda mais concentrado. Como é possível visualizar nos géis (**Figura 11**), as bandas de proteínas eluídas são muito fracas, mesmo utilizando colorações sensíveis, como Coomassie G e impregnação por nitrato de prata e diversas metodologias de concentração. Uma forma de reverter esse problema seria passar novos extratos de PME pela coluna para obter um eluído mais enriquecido de proteínas purificadas.

Utilizando o gel da **Figura 11 A**, as bandas foram cortadas, submetidas à digestão de proteínas e ao espectrômetro de massas ESI-Q-TOF acoplado a uma coluna de cromatografia líquida. A análise dos resultados demonstrou uma concentração muito alta de queratina, ainda maior que a concentração de proteínas de interesse. A contaminação por queratina é muito comum nesse tipo de análise, podendo vir do manuseio do material ou até mesmo dos tampões utilizados. Em todas as amostras enviadas à análise, houve uma contaminação por queratina, uma vez que a coluna de cromatografia líquida ficou com resquícios de queratina, essa contaminação comprometeu as análises de todas as bandas enviadas.

Após esses resultados, uma nova coluna de cromatografia por afinidade foi realizada. Entretanto, a visualização de bandas no gel foi fraca, uma vez que a

quantidade de proteínas após eluição com glicina-HCl é muito baixa. Para concentrar as proteínas, as amostras foram submetidas à centrifugação utilizando o sistema Amicon® (Merk) e em seguida foram enviadas para secagem no Speed-vac. Após as metodologias de concentração, foi possível visualizar bandas em gel impregnado com prata (**Figura 11 C**). Para a segunda amostra, foi selecionada uma análise de proteínas *in solution*, uma vez que a coloração com azul de coomassie coloidal não foi bem sucedida. A análise dos resultados demonstrou uma concentração alta de L-asparaginase de *E.coli*, que se deu por conta de uma contaminação na máquina provocada por uma amostra de outro usuário. Além dos problemas de contaminação, as amostras não passaram por um processamento de zip-tip, que seria um processo de purificação da amostra com a retirada de impurezas, antes de a amostra ser aplicada no espectrômetro, apenas pelo protocolo de digestão descrito no item 4.9, isso gerou um bloqueio na coluna C18 que faz parte do equipamento utilizado.

Mesmo com todos os problemas ocorridos nas duas metodologias realizadas de proteômica, a análise das amostras por meio do programa Mascot e pelo NCBI foi feita, uma vez que poderia haver proteínas de interesse. A corrida das bandas cortadas na primeira análise no programa Mascot e a corrida da digestão *in solution*, demonstraram proteínas de *P. nigrescens*.

A análise das bandas de C1, E1, E2 e E3 e da análise *in solution* demonstrou a presença de uma adesina que também pode ser encontrada como uma proteína hipotética HMPREF9419_1933. O mesmo domínio de adesão na adesina encontrada está presente na proteína hipotética, o que sugere que essa proteína também funciona como uma adesina. A adesina possui homologia com diversas sequências proteicas em espécies de *Prevotella* spp e também foi descrita em *P. gingivalis* (Pavloff *et al*, 1995; Pavloff *et al*, 1997 e Veith *et al.*, 2002). De acordo com esses estudos, a região da adesina identificada faz parte de uma proteína que possui um papel como gingipaina, sendo uma protease secretada por *P. gingivalis*, que possui um papel na degradação de citocinas pró-inflamatórias, essa mesma proteína possui diversos sítios de adesão. Primeiramente, as duas sequências proteicas foram submetidas aos programas CELLO e Psort, para confirmar que essas proteínas são PMEs. Os dois programas confirmaram que essas proteínas estão presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas. Em seguida, a sequência da adesina foi submetida a análise no programa HMMER

(Finn *et al.*, 2015), que é uma plataforma que gera uma árvore de homologia, demonstra função da proteína e domínios.

A proteína HMPREF9419_1933 possui um domínio de adesão conservado, que possui diversas funções, como adesão celular, lise e ligação a carboidratos. Repetições em tandem desse domínio constituem regiões de hemaglutinina/adesina e proteinases, como gingipaina. Esses domínios podem estar relacionados à adesão de outras espécies bacterianas e podem estar sendo expressos de modos diferentes (Pavloff *et al.*, 1995). Outro ponto importante é que esse domínio de adesão pode atuar junto com outros domínios presentes na proteína. E o presente estudo sugere que esse domínio pode ser capaz de se aderir a moléculas de laminina.

Todas as outras proteínas detectadas foram analisadas pelo programa CELLO e Psort, para localização das proteínas, e todos os resultados foram heterogêneos, tendo proteínas na região citoplasmática, membrana interna, periplasma e membrana externa. Esses resultados indicam que durante a extração de PMEs pode ter ocorrido uma possível contaminação por proteínas de outros compartimentos celulares. Outra possibilidade, é que os peptídeos identificados durante a espectrometria tenham homologia com as proteínas de outros compartimentos.

Entender o funcionamento dos mecanismos de virulência, como adesão, é de extrema importância para que futuramente, haja um tratamento para impedir uma possível infecção, impedindo a bactéria de colonizar determinados tecidos. As *Prevotella* são bactérias anaeróbias que não possuem um interesse clínico tão grande, como outras espécies. Porém, isso não reduz sua importância clínica, sendo uma bactéria muito presente em quadros de periodontite avançada e crônica e por estarem presentes em quadros de infecções sistêmicas. Essas espécies também vêm sendo relacionadas a algumas disbioses no trato gastrointestinal e até mesmo na cavidade vaginal. Bactérias desse gênero também tem chamado a atenção por estarem presentes em quadros de infecções sistêmicas. O presente estudo demonstrou a capacidade de adesão de duas espécies do gênero *Prevotella* que estão relacionadas a quadros infecciosos e também identificou uma adesina de *P. nigrescens* cepa 33563 que pode estar intimamente relacionada à capacidade de adesão e patogenicidade dessa espécie. Outras análises ainda precisam ser concluídas, como a identificação do ligante de *P. melaninogenica* e entender o porquê da cepa utilizada de *P. intermedia* não se aderir a

laminina. Porém, o estudo trouxe informações importantes que servem como um incentivo para o prosseguimento do projeto e para a compreensão dos mecanismos de adesão e patogenicidade de espécies bacterianas pouco estudadas e pouco compreendidas. Espera-se que os resultados possam ser adicionados a outros e utilizados para elucidação dos mecanismos de virulência do gênero *Prevotella*.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Foi detectada a capacidade de adesão de duas espécies do gênero *Prevotella*, *P. nigrescens* e *P. melaninogenica*, a laminina;
- ✓ Os resultados da espectrometria de massas revelaram a presença de uma adesina na cepa de *P. nigrescens*, que está presente na membrana externa, após análises nos programas CELLO e Psort;
- ✓ A localização de proteínas eluídas da coluna, foi bem heterogêneo, revelando uma possível contaminação de proteínas de outros compartimentos celulares.

8. REFERÊNCIAS

- Abe, T., Murakami, Y., Nagano, K., Hasegawa, Y., Moriguchi, K., Ohno, N., Shimosato, K. e Yoshimura, F. (2011). OmpA-like protein influences cell shape and adhesive activity of *Tannerella forsythia*. *Mol Oral Microbiol.* 26(6): 374-87.
- Adams, D. e Kern, P.A. (2016) A case of pituitary abscess presenting without a source of infection or prior pituitary pathology. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* pii: 16-0046. doi: 10.1530/EDM-16-0046.
- Albini, A. e Noonan, D.M. (2014). The ‘chemoinvasion’ assay, 25 years and still going strong: the use of reconstituted basement membranes to study cell invasion and angiogenesis, *Curr Opin Cell Biol.* 22(5): 677-89.
- Allison, H.E. e Hillman, J.D. (1997). Cloning and characterization of a *Prevotella melaninogenica* hemolysin. *Infect Immun.* 65(7):2765-71
- Alugupalli, K.R. e Kalfas, S. (1997). Characterization of the lactoferrin-dependent inhibition of the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* to fibroblasts and to a reconstituted basement membrane. *APMIS* 105: 680–688.
- Alves, G.G., Machado de Ávila, R.A., Chávez-Olórtegui, C.D. e Lobato, F.C. (2014) Clostridium perfringens epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe* 30:102-7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.08.016.
- Andrian, E., Grenier, D. e Rouabhia, M. (2004). In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 72(8): 4689-98.
- Arderiu, G., Peña, E., Aledo, R. e Badimon, L. (2012). Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *J. Thromb. Haemost.* 10 (9) 1895–1905.
- Arora, S., Uhlemann, A.C., Lowy, F.D. e Hook, M. (2016). A Novel MSCRAMM Subfamily in Coagulase Negative *Staphylococcal* Species. *Front Microbiol.* 7:540.
- Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., e Slots, J. (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*; 11(4):266–73.
- Aumailley, M. e Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76:253-265
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C., Kleinman, H.K., Marinkovich, M.P., Martin, G.R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J.H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J.R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L.M., Talts, J.F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., Von der Mark, K., Wewer, U.M., Yamada, Y. e Yurchenco, P.D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24(5):326–332.
- Aoyama, N., Suzuki, J.I., Kumagai, H., Ikeda, Y., Akazawa, H., Komuro, I., Minabe, M., Izumi, Y. e Isobe, M. (2017). Specific periodontopathic bacterial infection affects hypertension in male cardiovascular disease patients. *Heart Vessels.* doi: 10.1007/s00380-017-1042-z.
- Baeuerle, P.A. e Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-κB in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12:141-179.
- Barash, J.R. e Arnon, S.S. (2014) A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis.* 209(2):183-91. doi: 10.1093/infdis/jit449.

- Bartlett, J.G. (2012) Anaerobic bacterial infection of the lung. *Anaerobe*. (2):235-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.12.004.
- Bayer, E.A., Kenig, R. e Lamed, R. (1983) Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol*. 156(2):818-27.
- Beatty, N., Medina-Garcia, L., Al Mohajer, M. e Zangeneh, T.T. (2016). Polymicrobial Pituitary Abscess Predominately Involving *Escherichia coli* in the Setting of an Apoplectic Pituitary Prolactinoma. *Case Rep Infect Dis*. 2016:4743212. doi: 10.1155/2016/4743212.
- Beck, J.D., Garcia, R., Heiss, G., Vokonas, P.S. e Offenbacher, S. (1996). Periodontal disease and cardiovascular disease. *J. Periodontol*. 67:1123– 1137.
- Beck, J.D., Eke, P., Heiss, G., Madianos, P., Coupe, D., Lin, D., Moss, K., Elter, J. e Offenbacher, S. (2005). Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation*. 112(1):19-24.
- Benton, G., Kleinman, H.K., George, J. e Arnaoutova I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells, *Int. J. Cancer* 128 (8) 1751–1757.
- Bik, E.M., Long, C.D., Armitage, G.C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E.F., Nelson, K.E., Gill, S.R., Fraser-Liggett, C.M. e Relman, D.A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME journal*. 4(8):962-74.
- Boente, R.F., Pauer, H., Silva, D.N.S., Filho, J.S., Sandim, V., Antunes, L.C.M., Rocha, F.R.B., Zingali, R.B., Domingues, R.M.C.P. e Lobo, L.A. (2016). Differential proteomic analysis of outer membrane enriched extracts of *Bacteroides fragilis* grown under bile salts stress. *Anaerobe (London. Print) JCR*, v. 39, p. 84-90.
- Bolivar, I., Whiteson, K., Stadelmann, B., Baratti-Mayer, D., Gizard, Y., Mombelli, A., Pittet, D., Schrenzel, J. e Geneva Study Group on Noma (GESNOMA). (2012). Bacterial diversity in oral samples of children in Niger with acute noma, acute necrotizing gingivitis, and healthy controls. *PLoS Negl Trop Dis*.;6(3):e1556.
- Borges, S., Silva, J. e Teixeira, P. (2014) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet*. 289(3):479-89. doi: 10.1007/s00404-013-3064-9.
- Brinkman, M.B., McGill, M.A., Pettersson, J., Rogers, A., Matejková, P., Smajs, D., Weinstock, G.M., Norris, S.J. e Palzkill, T. (2008) A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin. *Infect Immun* 76: 1848–1857.
- Brook, I. e Walker, R.I. (1985) The role of encapsulation in the pathogenesis of anaerobic gram-positive cocci. *Canadian Journal of Microbiology*: 176--180.
- Brook, I. e Walker, R.I. (1986) The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. *Journal of Medical Microbiology*: 93-100.
- Brook, I. (1994) The role of encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections. *FEMS Microbiol Rev*. 13(1):65-74.
- Brook, I. (2002) Endocarditis due to anaerobic bacteria. *Cardiology*.98(1-2):1-5.
- Brook, I. e Frazier, E.H. (2003). Imune response to *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* in the sputum of patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Chest J*. 124(3):832–3.
- Brook, I. (2008) Infective endocarditis caused by anaerobic bacteria. *Arch Cardiovasc Dis*. 101(10):665-76. doi: 10.1016/j.acvd.2008.08.008.
- Brook, I. (2009) Pericarditis caused by anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 33(4):297-300. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.033.
- Brook, I. (2010) The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*. 16(3):183-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.12.001.

- Brouwer, S., Barnett, T.C., Rivera-Hernandez, T., Rohde, M. e Walker, M.J. (2016). Streptococcus pyogenes adhesion and colonization. *FEBS Lett.* 590(21):3739-3757. doi: 10.1002/1873-3468.12254.
- Burke, K.E. e Lamont, J.T. (2014). Clostridium difficile infection: a worldwide disease. *Gut Liver* 1-6. doi: 10.5009/gnl.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D. e Fairweather, N. (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 70, 5770–5778.
- Charles, P.G., Uçkay, I., Kressmann, B., Emonet, S. e Lipsky, B.A. (2015) The role of anaerobes in diabetic foot infections, *Anaerobe* doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.03.009.
- Charoen, K.M., Fallica, B., Colson, Y.L., Zaman, M.H. e Grinstaff, M.W. (2014). Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug–device combinations, *Biomaterials* 35 (7) 2264–2271.
- Chen, B., Wang, X. e Zhang, L. (2010) Culture medium for Bifidobacterium longum, composition comprising the same and preparation method. USP, US 0098667
- Chen, S. e Birk, D.E. (2013). The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly, *The FEBS journal*, 280 2120-2137.
- Chen, S., Zhang, C., Liao, C., Li, J., Yu, C., Cheng, X., Yu, Z., Zhang, M. e Wang, Y. (2015). Deletion of Invasion Protein B in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Influences Bacterial Invasion and Virulence. *Curr Microbiol.* 71(6):687-92.
- Chia, J.S., Yeh, C.Y. e Chen, J.Y. (2000). Identification of a fibronectin binding protein from Streptococcus mutans. *Infect Immun.* 2000 Apr;68(4):1864-70.
- Chung, A.E., Freeman, I.L. e Braginski, J.E. (1977). A novel extracellular membrane elaborated by a mouse embryonal Biophys Res Commun 79, 859–868. carcinoma-derived cell line. *Bioche.*
- Chung, A.E., Jaffe, R., Freeman, I.L., Vergnes, J.P., Braginski, J.E. e Carlin, B. (1979). Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* 16, 277–287.
- Cobo, F., Rodríguez-Granger, J., Sampedro, A. e Navarro-Marí, J.M. (2017) Infected breast cyst due to Prevotella buccae resistant to metronidazole. *Anaerobe.* 48:177-178. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.08.015.
- Colognato, H. e Yurchenco, P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218(2):213–234.
- Corrêa, J.D., Calderaro, D.C., Ferreira, G.A., Mendonça, S.M., Fernandes, G.R., Xiao, E., Teixeira, A.L., Leys, E.J., Graves, D.T. e Silva, T.A. (2017). Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status. *Microbiome.* 5(1):34. doi: 10.1186/s40168-017-0252-z.
- Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G.A. e Small, D.H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65, 108–120.
- Davies, J. K., Koomey, J.M. e Seifert, H.S. (1994). Pili (fimbriae) of *Neisseria gonorrhoeae*. In: *Fimbriae, adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines* (P.Klemm, ed.), pp.147-155. CRC Press, Boca Raton.
- Davies, H.A. e Borriello, S.P. (1990) Detection of capsule in strains of Clostridium difficile of varying virulence and toxigenicity. *Microbial Pathogenesis:* 141-146.
- Dhamija R, Graham JM Jr, Smaoui N, Thorland E, Kirmani S. Novel de novo SPOCK1 mutation in a proband with developmental delay, microcephaly and agenesis of corpus callosum. *Eur J Med Genet.* 2014 Mar;57(4):181-4. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.02.009.

- de Lillo, A., Teanpaisan, R., Fierro, J.F. e Douglas, C.W. (1996). Binding and degradation of lactoferrin by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 14 135-143.
- de O Ferreira, E., Araújo Lobo, L., Barreiros Petrópolis, D., dos S Avelar, K.E., Ferreira, M.C., Silva Filho, F.C. e Domingues, R.M. (2006). A *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interaction between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1. *Res Microbiol.* 157(10):960-6.
- Deepa, S.S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., Sugahara, K. e Fawcett, J.W. (2006). Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–17800.
- Deshmukh, S., Dive, N.A.M., Moharil R., e Munde P. (2016). Enigmatic insight into collagen. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 20, 276-283.
- de Faria Ghetti, F., Oliveira, D.G., de Oliveira, J.M., de Castro Ferreira, L.E.V.V., Cesar, D.E. e Moreira, A.P.B. (2017) Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Nutr.* doi: 10.1007/s00394-017-1524-x.
- de Steenhuijsen Piters, W.A., Huijskens, E.G., Wyllie, A.L., Biesbroek, G., van den Bergh, M.R., Veenhoven, R.H., Wang, X., Trzciński, K., Bonten, M.J., Rossen, J.W., Sanders, E.A. e Bogaert, D. (2016) Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J.* 10(1):97-108. doi: 10.1038/ismej.2015.99.
- DeStefano, F., Anda, R.F., Kahn, H.S., Williamson, D.F. e Russell, C.M. (1993). Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *Br. Med. J.* 306:688–691.
- Ding, F., Lyu, Y., Han, X., Zhang, H., Liu, D., Hei, W. e Liu, Y. (2014). Detection of periodontal pathogens in the patients with aortic aneurysm. *Chin Med J (Engl).* 127(23):4114-8.
- Dorn, B.R., Leung, K.P. e Progulsk-Fox, A. (1998). Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*. *Infection and immunity.* 66(12):6054-7.
- Doke, M., Fukamachi, H., Morisaki, H., Arimoto, T., Kataoka, H. e Kuwata, H. (2017). Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps. *Mol Oral Microbiol.* (4):288-300. doi: 10.1111/omi.12171.
- Duguid, J.P. e Gillies, R.R. (1957). Fimbriae and adhesive properties of dysentery bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 74:397–411.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* 339:259–268.
- Dyer, A., Brown, G., Stejskal, L., Laity, P.R. e Bingham, R.J. (2015). The *Borrelia afzelii* outer membrane protein BAPKO_0422 binds human factor-H and is predicted to form a membrane-spanning β -barrel. *Biosci Rep.* 35(4). pii: e00240. doi: 10.1042/BSR20150095.
- Eiring, P., Manncke, B., Gerbracht, K. e Werner, H. (1995). *Bacteroides fragilis* adheres to laminin significantly strong than *Bacteroides thetaotaomicron* and other species of the genus. *Zentralbl Bakteriologie.* 282(3):279-86.
- Eiring, P., Waller, K., Widmann, A. e Werner, H. (1998). Fibronectin and laminin binding of urogenital and oral *Prevotella* species. *Zentralbl Bakteriologie.* 288(3):361–72.
- Ekblom, P., Lonai, P. e Talts, J.F. (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol.* 22, 35–47.
- Emtidy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skumik, M., Kapperud, P. e Wadstrom, T. (1989). Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence of yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J. Bacteriol.* 171:6674-79.

- Enwonwu CO, Falkler WA, Idigbe EO. (2000). Oro-facial gangrene (noma/cancrum oris): pathogenetic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11(2):159-71. Review.
- Ferreira, E., Jourlin, M., Yates, E.A. e Goldner, M. (2011). Anaerobe/aerobe environmental flux determines protein (expression profiles of *Bacteroides fragilis*, a redox pathogen. *Anaerobe*, 17(1): 4-14.
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A., Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010). Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis.* 31(21):3573-9. doi: 10.1002/elps.201000197.
- Finn, R.D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B.L., Wheeler, T.J., Schreiber, F., Bateman, A. e Eddy, S.R (2015). *Nucleic Acids Research Web Server Issue 43: W30-W38.*
- Frantz, C., Stewart, K.M. e Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123, 4195-4200.
- Friedlander, R.S., Vogel, N. e Aizenberg, J. (2015). Role of Flagella in Adhesion of *Escherichia coli* to Abiotic Surfaces. *Langmuir.* 31(22):6137-44. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00815.
- Finkelstein, R., Nachum, Z., Reissman, P., Reiss, N.D., Besser, M., Trajber, I. e Melamed, Y. (1992). Anaerobic osteomyelitis in patients with Gaucher's disease. *Clin Infect Dis.* 15(5):771-3.
- Galvão, B.P.G.V., Weber, B.W., Rafudeen, M.S., Ferreira, E.O., Patrick, S. e Abratt, V.R. (2014) Identification of a Collagen Type I Adhesin of *Bacteroides fragilis*. *PLoS ONE* 9(3): e91141.
- Gao, W., Sweeney, C., Walsh, C., Rooney, P., McCormick, J., Veale, D.J. e Fearon, U. (2013). Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. *Ann. Rheum. Dis.* 72 (6) 1080–1088.
- García-Sánchez, J.E., García-Sánchez, E., Martín-Del-Rey, Á. e García-Merino, E. (2015) Anaerobic bacteria 150 years after their discovery by Pasteur. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 33(2):119-28. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.012.
- Gillot, P., André, P. e Content, J. (1999). *Listeria monocytogenes* adhesins for fibronectin. *Infect. Immun.* 64(12): 6698-6701.
- Gomes, B.P., Drucker, D.B. e Lilley, J.D. (1994). Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.*;27(6):291–8.
- Gomes, B.P., Lilley, J.D. e Drucker, D.B. (1996). Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.*;29(2):69–75.
- Gordon, M.K. e Hahn, R.A.(2010). Collagens. *Cell Tissue Res.*339,247–257
- Griffee, M.B., Patterson, S.S., Miller, C.H., Kafrawy, A.H. e Newton, C.W. (1980). The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* ;50(5):457-61.
- Guyot, G. (1908). Über die bakterielle haemagglutination. *Zentbl. Bakteriol. Abt. I Orig.* 47:640–653.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Patel, M.R. e Song, X. (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*; 23: 196–205.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F. e Sorokin, L.M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85(3):979–1000.
- Haraldsson, G., Meurman, J.H., Könönen, E. e Holbrook, W.P. (2005). Properties of hemagglutination by *Prevotella melaninogenica*. *Anaerobe.* 11(5):285-9. Epub 2005 Apr 26

- Hassell, J.R., Robey, P.G., Barrach, H.J., Wilczek, J., Rennard, S.I. e Martin, G.R. (1980). Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci* 77, 4494–4498.
- Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S. e Benno, Y. (2007). *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.*;57(Pt 5):941–6.
- Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M.C., Collignon, A. e Karjalainen, T. (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 149: 2779–2787
- Hillman, J.D., Maiden, M.J.F., Pfaller, S.P., Martin, L., Duncan, M.J. e Socransky, S.S. (1993). Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque. *J. Periodontal Res.* 28:173–179.
- Hobb, R.I., Fields, J.A., Burns, C.M. e Thompson, S.A. (2009). Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*; 155(pt3): 979-988.
- Hofstad, T. (1989). Virulence determinants in nonsporeforming anaerobic bacteria. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 62:15–24.
- Hofstad, T. (1992) Virulence factors in anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 11(11):1044-8. Review.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P. e Moore, W.E.C. (1977). *Anaerobic laboratory manual*. 4th edn. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Holdeman, L.V., Kelley, R.W., Moore, W.E.C. e Genus I. (1984). *Bacteroides* In: Holt JG, ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins: 604–631.
- Horie, M., Ishiyama, A., Fujihira-Ueki, Y., Sillanpää, J., Korhonen, T.K. e Toba, T. (2002). Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J Appl Microbiol.* 2002;92(3):396-403.
- Horie, M., Murakami, T., Sato, T., Tarusawa, Y., Nakamura, S. e Toba, T. (2005) Anaerobic induction of adherence to laminin in *Lactobacillus gasseri* strains by contact with solid surface. *Curr Microbiol.* 51(4):275-82.
- Houwink, A.L. e van Iterson, W. (1949). Electron microscopical observation on bacterial cytology. II. A study on flagellaton. *Biochim. Biophys. Acta* 5: 10-44.
- Hsiao, W.W., Li, K.L., Liu, Z., Jones, C., Fraser-Liggett, C.M. e Fouad, A.F. (2012) Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics.* 13:345. doi: 10.1186/1471-2164-13-345.
- Hynes, R.O. (2012). The evolution of metazoan extracellular matrix. *J Cell Biol* 196:671–679. doi: 10.1083/jcb.201109041.
- Iki, K., Kawahara, K., Sawamura, S., Arakaki, R., Sakuta, T., Sugiyama, A., Tamura, H., Sueda, T., Hamada, S. e Takada, H. (1997). A novel component different from endotoxin extracted from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 activates lymphoid cells from C3H/HeJ mice and gingival fibroblasts from humans. *Infect Immun:* 65: 4531–4538.
- Inoue, S. (1989). Ultrastructure of basement membranes. *Int. Ver. Citol.* 117:57-98.
- Iozzo, R.V., Zoeller, J.J. e Nyström, A. (2009). Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Mol. Cells* 27, 503–513.
- Iozzo, R.V. e Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.*
- Isberg, R.R., Voorhis, D.L. e Falkow, S. (1987). Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769–778.

- Ishaq, H.M., Mohammad, I.S., Guo, H., Shahzad, M., Hou, Y.J., Ma, C., Naseem, Z., Wu, X., Shi, P. e Xu, J. (2017) Molecular estimation of alteration in intestinal microbial composition in Hashimoto's thyroiditis patients. *Biomed Pharmacother.*;95:865-874. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.101.
- Itoh, T., Nakamura, H., Kishi, J. e Hayakawa, T. (2009) The activation of matrix metalloproteinases by a whole-cell extract from *Prevotella nigrescens*. *J Endod.* 35(1):55-9. doi: 10.1016/j.joen.2008.09.012.
- Jacinto, R.C., Gomes, B.P., Ferraz, C.C., Zaia, A.A. e Filho, F.J. (2003). Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*; 18(5):285–92.
- Jalalvand, F., Su, Y.C., Mörgelin, M., Brant, M., Hallgren, O., Westergren-Thorsson, G., Singh, B. e Riesbeck, K. (2013). Haemophilus influenzae protein F mediates binding to laminin and human pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis.* 207(5): 803-13.
- Jansen, H.J., Grenier, D. e Van der Hoeven, J.S. (1995). Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*: 10: 138-145.
- Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D.M., Baron, E.J., Wexler, H.M. e Finegold, S.M. (2002). *Wadsworth—KTL anaerobic bacteriology manual*, 6th ed. Star Publishing Co., Belmont, CA.
- Jr Falkler, W.A., Enwonwu, C.O. e Idigbe, E.O. (1999). Microbiological understandings and mysteries of noma (cancrum oris). *Oral Dis*;5(2):150–5.
- Jun, K.C., Barua, P.K., Zambon, J.J. e Neiders, M.E. (1989). Proteolytic activity in black-pigmented *Bacteroides* species. *J. Endod.* 15:463–467.
- Kaewsrichan, J., Douglas, C.W., Nissen-Meyer, J., Fimland, G. e Teanpaisan, R. (2004). Characterization of a bacteriocin produced by *Prevotella nigrescens* ATCC 25261. *Lett Appl Microbiol.* 39(5):451-8.
- Kalfas, S., Tigyi, Z., Wikstrom, M. e Naidu, A.S. (1992). Laminin binding to *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 7: 235–239.
- Kanoe, M., Nagai, S. e Toda, M. (1985) Adherence of *Fusobacterium necrophorum* to Vero cells. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 260(1):100-7.
- Keane, F.M., Loughman, A., Valtulina, V., Brennan, M., Speziale, P. e Foster, T.J. (2007). Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.*63(3):711-23.
- Keeley, F.W. (2013). The evolution of elastin. In: *Evolution of Extracellular Matrix* (ed. Keeley, F. W., Mecham, R. P.), Springer, Berlin Heidelberg (pp 73-119).
- Kentos, A., Motte, S., Nonhoff, C., Jacobs, F., De Smet, J.M., Serruys, E. e Thys, J.P. (1994) *Prevotella bivia* as an unusual cause of endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13(2):142-5.
- Kim, S.J., Ha, M.S., Choi, E.Y., Choi, J.I. e Choi, I.S. (2005). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 43(1):51-8.
- Kim, Y.M., Romero, R. e Oh, S.Y. (2005). Toll-like receptor 4: a potential link between “danger signals”, the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.*
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K. e Martin, G.R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochem* 21, 6188–6193.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W. e Martin, G.R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 28;25(2):312-8.

- Kleinman, H.K. e Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):378-86. Review.
- Klemm, P. e Schembr, M.A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* 290,27-35.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Gohring, W. e Timpl, R. (1998). Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* 282(1):99–109.
- Könönen, E. (1993). Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. *FEMS Immunol Med Microbiol*:6(2):201-5.
- Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., Kimura, S. e Hamada, S. (1996). Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun* 64: 756–762.
- Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K.R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T. e Shizukuishi, S. (2004). Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol*; 19: 168–76.
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y.S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I. e Bäckhed, F. (2015) Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* ;22(6):971-82. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.001.
- Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A. e Minton, N.P. (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature.* 467(7316):711-3. doi: 10.1038/nature09397.
- Kulekci, G., Leblebiciougu, B., Keskin, F., Ciftci, S. e Badur, S. (2008). Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. *Anaerobe* ; 14: 49 –54.
- Kumaran, D., Kalab, M., Rood, I.G., de Korte, D. e Ramirez-Arcos, S. (2014) Adhesion of anaerobic bacteria to platelet containers. *Vox Sang.* 107(2):188-91. doi: 10.1111/vox.12141.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685.
- Lähteenmäki, K., Virkola, R., Pouttu, R., Kuusela, P., Kukkonen, M. e Korhonen T.K. (1995). Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun.* 63(9):3659-64.
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J.M. e Frankel, G. (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 15:1796e808.
- Lambert, B., De Ridder, L., De Vos, F., Slegers, G., de Gelder, V., Van de Wiele, C. e Thierens H. (2006). Assessment of supra-additive effects of cytotoxic drugs and low dose rate irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 (10) 1021–1028.
- Langevin, S., Pichon, M., Smith, E., Morrison, J., Bent, Z., Green, R., Baker, K., Solberg, O., Gillet, Y., Javouhey, E., Lina, B., Katze, M.G. e Josset, L. (2017) Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study. *J Gen Virol.* doi: 10.1099/jgv.0.000920.
- Lantz, M.S., Switalski, L.M., Komman, K.S. e Hook, M. (1985). *Bacteroides intermedius* binds fibrinogen. *J. Bacterial.* 1 63:623- 28.
- Lantz, M.S., Rowland, R.W., Switalski, L.M. e Hook, M. (1986). Interactions of *Bacteroides gingivalis* with fibrinogen. *InJect. Immun.* 54:654-58.

- Lantz, M.S., Allen, R.D., Vail, T.A., Switalski, L.M. e Hook, M. (1991). Specific cell components of *Bacteroides gingivalis* mediate binding and degradation of human fibrinogen. *J Bacteriol.* 173:495-504.
- Larsen, J.M., Musavian, H.S., Butt, T.M., Ingvorsen, C., Thysen, A.H. e Brix, S. (2015). Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. *Immunology.* 144(2):333-42. doi: 10.1111/imm.12376.
- Lebleu, V.S., MacDonald, B. e Kalluri, R. (2007). Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med* 232:1121-1129.
- Leffler, H. e C. Svanborg-Eden. (1980). Chemical-identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary-tract epithelial cells and agglutinating human-erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 8:127-134.
- Li, Q., Li, Z., Qu, Y., Li, H., Xing, J. e Hu, D. (2015). A study of outer membrane protein and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 27(7):611-5. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.014.
- Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad, L. e Olsen, I. (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*;13(4):547-58.
- Liu, M. e Chen, S. (2015). A novel adhesive factor contributing to the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 24;5:14449.
- Lobo, L.A. (2006). Adhesive properties of the purified plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett.* 262(2):158-62.
- Lun, S., Miranda, D., Kubler, A., Guo, H., Maiga, M.C., Winglee, K., Pelly, S. e Bishai, W.R. (2014). Synthetic lethality reveals mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to β -lactams. *MBio.* 5(5):e01767-14. doi: 10.1128/mBio.01767-14.
- Macedo Paizan, M.L. e Vilela-Martin, J.F. (2014). Is there an association between periodontitis and hypertension? *Curr Cardiol Rev* 10:355-361
- Maeda, N., Okamoto, M., Kondo, K., Ishikawa, H., Osada, R., Tsurumoto, A. e Fujita, H. (1998). Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiol Immunol.*;42(9):583-9.
- Maeda, Y., Kurakawa, T., Umemoto, E., Motooka, D., Ito, Y., Gotoh, K., Hirota, K., Matsushita, M., Furuta, Y., Narazaki, M., Sakaguchi, N., Kayama, H., Nakamura, S., Iida, T., Saeki, Y., Kumanogoh, A., Sakaguchi, S. e Takeda, K. (2016) Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* 68(11):2646-2661. doi: 10.1002/art.39783.
- Maestre, J.R., Bascones, A., Sánchez, P., Matesanz, P., Aguilar, L., Giménez, M.J., Pérez-Balcabao, I., Granizo, J.J. e Prieto, J. (2007). Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter.* 20(1):61-7.
- Matsui, A., Jin, J.O., Johnston, C.D., Yamazaki, H., Houry-Haddad, Y. e Rittling, S.R. (2014). Pathogenic bacterial species associated with endodontic infection evade innate immune control by disabling neutrophils. *Infect Immun.* 82(10):4068-79. doi: 10.1128/IAI.02256-14.
- Mattila, K.J., Nieminen, M.S., Valtonen, V.V., Rasi, V.P., Kesaniemi, Y.A., Syrjala, S.L., Jungell, P.S., Isoluoma, M., Hietaniemi, K., Jokinen, M.J. e Huttunen, J.K. (1989). Association between dental health and acute myocardial infarction. *Br. Med. J.* 298:279-282.
- Mehmood, M., Jaffar, N., Nazim, M. e Khasawneh, F., A. (2014) Bacteremic skin and soft tissue infection caused by *Prevotella loeschii*. *BMC Infect Dis.* 2014 Mar 24;14:162. doi: 10.1186/1471-2334-14-162.

- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G. e Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131:2247–2256.
- Miner, J. H. e Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 255–284.
- Mitsuoka, T. (1992) The human gastrointestinal tract. In: Wood BJB (ed) *The lactic acid bacteria in health and disease*. Elsevier, Amsterdam, pp 69–114
- Miyashita, M., Oishi, S., Kiso, A., Kikuchi, Y., Ueda, O., Hirai, K., Shibata, Y. e Fujimura, S. (2010). Hemoglobin binding activity and hemoglobin-binding protein of *Prevotella nigrescens*. *Eur J Med Res.* 15:314-8.
- Morris, J.G. (1994) Obligately anaerobic bacteria in biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol.* 48(2):75-106.
- Morita, A., Sugimoto, E. e Kitagawa, Y. (1985). Post-translational assembly and glycosylation of laminin subunits in parietal endoderm-like F9 cells. *Biochem. J.*, 229, 259–264.
- Moutsopoulos, N.M. e Madianos, P.N. (2006). Low-Grade inflammation in chronic infectious diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1088(1):251-64.
- Mouw, J.K., Ou, G. e Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(12):771-85.
- Mullally, B.H., Dace, B., Shelburne, C.E., Wolff, L.F. e Coulter, W.A. (2000). Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*; 35: 232–41.
- Murphy-Ullrich, J.E. e Sage, E.H. (2014). Revisiting the matricellular concept, *Matrix Biol.* 37 1-14.
- Myers, L.L., Firehammer, B.D., Shoop, D.S. e Border, M.M. (1984) *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infection and Immunity* 241-244.
- Nadkarni, M.A., Browne, G.V., Chhour, K.L., Byun, R., Nguyen, K.A., Chapple, C.C., Jacques, N.A. e Hunter, N. (2012). Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;31(11):2989–99.
- Nagy, E., Manncke, B. e Werner, H. (1994). Fibronectin and vitronectin binding of *Bacteroides fragilis* and eight other species of the genus. *Zentralbl Bakteri.* 281(2):235-9.
- Nakazawa, F., Zambon, J.J. e Reynolds, H.S. (1988) Serological studies of oral *Bacteroides intermedius*. *Genco RJ Infect Immun.* 56(6):1647-51.
- Nesbitt, W.E., Doyle, R.J., Taylor, K.G., Staat, R.H. e Arnold, R.R. (1982). Positive cooperativity in the binding of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect. Immun.* 35:157–165.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. e Ehrhardt, W. (1988). Improved staining od proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 6, 255-262.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593–656.
- Ofek, I., Beachey, E.H., Jefferson, W. e Campbell, G.L. (1975). Cell membrane-binding properties of group A *streptococcal* lipoteichoic acid. *J. Exp. Med.* 141:990–1003.
- Ofek, I., Mirelman, D. e Sharon, N. (1977). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265:623–625.
- Ofek, I. e Doyle, R.J. (1994). *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*. p. 94–135. Chapman & Hall, New York, N.Y.

- Ofeck, I., Hasty, D.L. e Doyle, R.J. (2003). Bacterial adhesion to animal cells and tissues. ASM PRESS. Washington, D.C.
- Ogrendik, M., Kokino, S., Ozdemir, F., Bird, P.S. e Hamlet, S. (2005). Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. *MedGenMed*. 7(2):2.
- Okada, Y., Kanoe, M., Yaguchi, Y., Watanabe, T., Ohmi, H. e Okamoto, K. (1999) Adherence of *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* to different animal cells.. *Microbios*. 99(393):95-104.
- Ong, C.L., Ulett, G.C., Mabbett, A.N., Beatson, S.A., Webb, R.I., Monaghan, W., Nimmo, G.R., Looke, D.F., McEwan, A.G. e Schembri, M.A. (2008). Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J Bacteriol*. 190(3):1054-63.
- Orkin, R.W., Gehron, P., McGoodwin, E.B., Martin, G.R., Valentine, T. e Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145, 204–220.
- Palmer, L.J., Chapple, I.L., Wright, H.J., Roberts, A. e Cooper, P.R. (2012). Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria. *J Periodontal Res*. 47(4):439-45. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01451
- Parthiban, P.S., Mahendra, J., Logaranjani, A., Shanmugam, S., Balakrishnan, A., Junaid, M. e Namasivayam, A.J. (2017). Association between specific periodontal pathogens, Toll-like receptor-4, and nuclear factor- κ B expression in placental tissues of pre-eclamptic women with periodontitis. *Investig Clin Dent*. doi: 10.1111/jicd.12265.
- Patterson, J.L., Stull-Lane, A., Girerd, P.H. e Jefferson, K.K. (2010) Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 156(Pt 2):392-9. doi: 10.1099/mic.0.034280-0
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J. e Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol*. 48:585–617.
- Paulsson, M., Ljung, A. e Wadström, T. (1992). Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative *Staphylococci* by particle agglutination assays. *J. Clin. Microbio*. 30(8): 2006-12.
- Pavloff, N., Potempa, J., Pike, R.N., Prochazka, V., Kiefer, M.C., Travis, J. e Barr, P.J. (1995). Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. Biosynthesis as a proteinase-adhesin polyprotein. *J. Biol. Chem*. 270(3):1007-1010
- Pavloff, N., Pemberton, P.A., Potempa, J., Chen, W.C., Pike, R.N., Prochazka, V., Kiefer, M.C., Travis, J. e Barr, P.J. (1997). Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases. *J Biol Chem*. 272(3):1595-600.
- Pinheiro, I., Robinson, L., Verhelst, A., Marzorati, M., Winkens, B., den Abbeele, P.V. e Possemiers, S. (2017). A yeast fermentate improves gastrointestinal discomfort and constipation by modulation of the gut microbiome: results from a randomized double-blind placebo-controlled pilot trial. *BMC Complement Altern Med*. 17(1):441. doi: 10.1186/s12906-017-1948-0.
- Pinne, M., Matsunaga, J. e Haake, D.A. (2012). Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol*. 194(22):6074-87.
- Pittman, K.A., Kakshmanan, S. e Bryant, M.P. (1967). Oligopeptide uptake by *Bacteroides ruminicola*. *J Bacteriol*: 93: 1499– 1508.
- Pizarro-Cerdá, J. e Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 124(4):715-27.

- Poschl, E., Schlotzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. e Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131:1619–1628.
- Pozzi, A., Yurchenco, P.D. e Iozzo, R.V. (2016). The nature and biology of basement membranes, *Matrix Biology*, doi:10.1016/j.matbio.2016.12.009.
- Ravela, J., Gajera, P., Abdob, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S.K., McCullea, S.L., Karlebach, K., Gorlee, K., Russell, J., Tackett, C.O., Brotmana, R.M., Davis, C.C., Ault, K., Peraltae, L. e Forney, L.J. (2017) Vaginal microbiome of reproductive-age women. PNAS Direct Submission. doi:10.1073/pnas.1002611107
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 3(1): a004978 Cross Ref Pub Med
- Ruggiero, F. e Koch, M. (2008). Making recombinant extracellular matrix proteins. *Methods* 45, 75-85.
- Rutter, J.M. e Jones, G.W. (1973). Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli*—a model for vaccination with a virulence determinant? *Nature* 242:531–532.
- Saini, S., Gupta, N. Aparna, Batra G. e Arora, D.R. (2003). Role of anaerobes in acute pelvic inflammatory disease. *Indian J Med Microbiol.* 21(3):189-92.
- Sánchez, B., Arias, S., Chaignepain, S., Denayrolles, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P. e Urdaci, M.C. (2009). Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology.* 155(Pt 5):1708-16. doi: 10.1099/mic.0.025288-0.
- Sanchez, L., Calvo, M. e Brock, J.H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* 67, 657-661.
- Satterwhite, T.K., Evans, D.G., DuPont, H.L. e Evans, D.J.Jr. (1978). Role of *Escherichia coli* colonisation factor antigen in acute diarrhoea. *Lancet* ii:181–184.
- Schaefer, L. e Iozzo, R.V. (2008). Biological functions of the small leucinerich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 283:21305–9.
- Schedl, W.M., Valone, J.A. e Sande, M.A. (1978). Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. *J. Clin. Investig.* 61:1394–1404.
- Scheller, E.V. e Cotter, P.A. (2015). *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis.* 73(8):ftv079.
- Schwartz, N.B. e Domowicz, M. (2004). Proteoglycans in brain development. *Glycoconj. J.* 21, 329–341.
- Sethi, M.K. e Zaia, J. (2017). Extracellular matrix proteomics in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem.* 409(2):379-394.
- Sekiro, I., Russell, S.L., Antunes, L.C. e Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009. Review.
- Shah, H.N. e Collins, D.M. (1990). Notes: *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol.* 40(2):205-8.
- Shah, H.N. e Gharbia, S.E. (1992). Biochemical and Chemical Studies on Strains Designated *Prevotella intermedia* and Proposal of a New Pigmented Species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 42 (4): 542–546
- Schnepf, A., Komp Lindgren, P., Hülsmann, H., Kröger, S., Paulsson, M. e Hartmann, U. (2005). Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 280(12):11274-80.

- Shibata, Y., Fujimura, S. e Nakamura, T. (1993). Purification and Partial Characterization of an Elastolytic Serine Protease of *Prevotella intermedia*. Applied and environmental microbiology, p. 2107-2111.
- Siebold, B., Qian, R.A., Glanville, R.W., Hofmann, H., Deutzmann, R. e Kuhn, K. (1987). Construction of a model for the aggregation and cross-linking region (7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the alpha 1 and alpha 2 chains in this region. Eur J Biochem 168(3): 569-575.
- Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, PH. e Korhonen, T.K. (2000). Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. J Bacteriol. 182(22):6440-50.
- Silverblatt, F.J. (1974). Host-parasite interaction in the rat renal pelvis: a possible role for pili in the pathogenesis of pyelonephritis. J. Exp. Med. 140:1696–1711.
- Sirigi Reddy, A.R., Girinathan, B.P., Zapotocny, R. e Govind, R. (2013) Identification and characterization of Clostridium sordellii toxin gene regulator. J Bacteriol. 195(18):4246-54. doi: 10.1128/JB.00711-13.
- Smani, Y., McConnell, M.J. e Pachón, J. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS One 7(4):e33073.
- Smith, H.W. e Lingood, M.A. (1971). Observations on the pathogenic properties of the K88, HLY and ENT plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. j. Med. Microbiol. 4,467-485.
- Simon Davis, D.A. e Parish, C.R. (2013). Heparan sulfate: a ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity. Front. Immunol. 4, 470.
- Simpson, W.A. e Beachey, E.H. (1983). Adherence of group A streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. Infect. Immun. 39:275–279.
- Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R. e Podbielski, A. (1999). Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect. Immun. 67, 871–878.
- Stingu, C.S., Schaumann, R., Jentsch, H., Eschrich, K., Brosteanu, O. e Rodloff, A.C. (2013). Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. J Investig Clin Dent. Feb;4(1):20-5.
- Stones, D.H. e Krachler, A.M. (2016). Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. Biochemical Society Transactions 44 1571–1580.
- (Summanen, P., Baron, E.J., Citron, D.M., Strong, C.A. Wexler, H. M. e Finegold, S.M. (1998). Anaerobic Bacteriology Manual 5^o Edição. Star Publishing Company. P.O. Box 68. Belmont, CA 94002.
- Takagi, J., Yang, Y., Liu, J.H., Wang, J.H. e Springer, T.A. (2003). Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic β -propeller interface. Nature 424, 969–974.
- Tamm, L.K., Hong, H. e Liang, B. (2004) Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. Biochim Biophys Acta. 1666(1-2):250-63.
- Tanaka, S., Yoshida, M., Murakami, Y., Ogiwara, T., Shoji, M., Kobayashi, S., Watanabe, S., Machino, M. e Fujisawa, S. (2008). The relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor. J Clin Pediatr Dent. Spring;32(3):195-200.
- Tanbe, A.F. e Khalil, R.A. (2010). Circulating and Vascular Bioactive Factors during Hypertension in Pregnancy. Curr Bioact Compd.6:60-75.

- Tchoupa, A.K., Lichtenegger, S., Reidl, J. e Hauck, C.R. (2015). Outer membrane protein P1 is the CEACAM-binding adhesin of *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol.* 98(3):440-55. doi: 10.1111/mmi.13134.
- Teanpaisan, R., Douglas, C.W.I. e Walsh, T.F. (1995). Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy sites. *J. Periodont. Res.* 30: 245- 251.
- Theocharis, A.D., Gialeli, C., Hascall, V.C. e Karamanos, N.K. (2012). Extracellular matrix: a functional scaffold, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling.*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, pp. 3-20.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C. e Karamanos, N.K. (2015). Extracellular Matrix Structure. *Adv Drug Deliv Rev* 1;97:4-27.
- Thomaidis, C., P., Pantazatou, A., Kamariotis, S., Vlachos, K., Koussos, G., Panagiotou, P., e Stylianakis, A. (2015) Sonication assisted microbiological diagnosis of implant-related infection caused by *Prevotella disiens* and *Staphylococcus epidermidis* in a patient with cranioplasty. 8:307 DOI 10.1186/s13104-015-1274-x.
- Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. e Kühn, K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Bio chem.* 120(2):203-11.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M. e Martin, G.R. (1979). Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933–9937.
- Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H. e Wick, G. (1983). Nidogen: a new self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* 137, 455–465.
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N. e Korhonen, T. K. (1995). A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2467–2471
- Tomassen, J. (2010). Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. *Microbiology.* 156(Pt 9):2587-96.
- Tramont, E.C. (1981). Adhesion of *Neisseria gonorrhoeae* and disease. *Ciba Found Symp.* 80:188-201.
- Triches, T.C., de Figueiredo, L.C., Feres, M., de Freitas, S.F., Zimmermann, G.S. e Cordeiro, M.M. (2014) Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion. *J Dent Child (Chic).* 81(1):14-9.
- Tunney, M.M., Field, T.R., Moriarty, T.F. Patrick, S., Doering, G., Muhlebach, M.S., Wolfgang, M.C., Boucher, R., Gilpin, D.F., McDowell, A. e Elborn, J.S. (2008). Detection of Anaerobic Bacteria in High Numbers in Sputum from Patients with Cystic Fibrosis *Am J Respir Crit Care Med* Vol 177. pp 995–1001.
- Tzianabos, A.O., Kasper, D.L. e Onderdonk, A.B. (1995) Structure and function of *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharides: relationship to induction and prevention of abscesses. *Clin Infect Dis.* 20 Suppl 2:S132-40.
- Ulrich, M., Beer, I., Braitmaier, P., Dierkes, M., Kummer, F., Krismer, B., Schumacher, U., Gräpler-Mainka, U., Riethmüller, J., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Højby, N., Bellon, G. e Döring, G. (2010). Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 65(11):978–84.
- Veith, P.D., Talbo, G.H., Slakeski, N., Dashper, S.G., Moore, C., Paolini, R.A. e Reynolds, E.C. (2002). Major outer membrane proteins and proteolytic processing of RgpA and Kgp of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Biochem. J.* 363(Pt 1):105-115
- Vercellotti, G.M., McCarthy, J.B., Lindholm, P., Peterson, P.K., Jacob, H.S. e Furcht, L.T. (1985). Extracellular matrix proteins (Fibronectin, Laminin and type IV collagen) bind and aggregate bacteria. *Am. J. Pathol.* 120 (1): 13-21.

- Vuckovic, D., Dagley, L.F., Purcell, A.W. e Emili, A. (2013). Membrane Proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges. *Proteomics*, 13: 104-423.
- Wahren, A. e Gibbons, R.J. (1970). Amino acid fermentation by *Bacteroides melaninogenicus*. *Antonie van Leeuwenhoek*: 36: 149-159.
- Walz, A., Odenbreit, S., Mahdavi, J., Boren, T. e S. Ruhl. (2005). Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology* 15:700-708.
- Wang, Y., Wei, Y., Yuan, S., Tao, H., Dong, J., Zhang, Z., Tian, W. e Liu, C. (2016). *Bacillus anthracis* S-layer protein BslA binds to extracellular matrix by interacting with laminin. *BMC Microbiol.* 16(1):183.
- Watt, P.J. e Ward, M.E. (1980). Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species to mammalian cells, p. 251-288. In E. H. Beachey (ed.), *Bacterial Adherence*. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Weiss, M.B., Abel, E.V., Mayberry, M.M., Basile, K.J., Berger, A.C. e Aplin, A.E. (2012). TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells, *Cancer Res.* 72 (24) 6382-6392.
- Westerlund, B., Kuusela, P., Risteli, J., Risteli, L., Vartio, T., Rauvala, H., Virkola, R. e Korhonen, T.K. (1989). The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol. Microbiol.* 3:329-337.
- Wick, E.C. e Sears, C. L. (2010). *Bacteroides* spp. and diarrhea. *Curr Opin Infect Dis* 470-4. doi: 10.1097/QCO
- Wimley, W.C. (2003). The versatile b-barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 404- 411.
- Winkler, J.R., John, S.R., Kramer, R.H., Hoover, C.I. e Murray, P.A. (1987). Attachment of oral bacteria to a basement-membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infect Immun.* 55(11):2721-6.
- Wood, E., Tamborero, S., Mingarro, I., Esteve-Gassent, M.D. (2003). BB0172, a *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein that binds integrin $\alpha 3\beta 1$. *J Bacteriol.* 195(15):3320-30. doi: 10.1128/JB.00187-13.
- Wu CC, Johnson JL, Moore WE, Moore LV.. Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 536-541, 1992.
- Wu, C.C. e Yates, J.R. 3rd. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol.* 21(3):262-7.
- Wu, X.B., Tian, L.H., Zou, H.J., Wang, C.Y., Yu, Z.Q., Tang, C.H., Zhao, F.K. e Pan, J.Y. (2013). Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. *Res Microbiol.* 164(8):848-55. doi: 10.1016/j.resmic.2013.06.008.
- Yakob, M., Söder, B., Meurman, J.H., Jogestrand, T., Nowak, J. e Söder, P.Ö. (2011). *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis. *J Periodontal Res* 46(6):749-55. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01398
- Yamashita, S., Lukacik, P., Barnard, T.J., Noinaj, N., Felek, S., Tsang, T.M., Krukonis, E.S., Hinnebusch, B.J. e Buchanan, S.K. (2011). Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure.* 19(11):1672-82.
- Yang, J. e Ji, Y. (2014). Investigation of *Staphylococcus aureus* adhesion and invasion of host cells. *Methods Mol Biol.* 1085:187-94. doi: 10.1007/978-1-62703-664-1_11.

- Yang, J.J., Kwon, T.Y., Seo, M.J., Nam, Y.S., Han, C.S. e Lee, H.J. (2013). 16S ribosomal RNA identification of *Prevotella nigrescens* from a case of cellulitis. *Ann Lab Med.* 33(5):379-82. doi: 10.3343/alm.2013.33.5.379.
- Yang X, Qiao D, Meyer K, Pier T, Keles S, Friedl A. (2012). Angiogenesis induced by signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) is dependent on autocrine activity of proliferin. *J. Biol. Chem.* 287 (9) 6490–6502.
- Yao, Y. (2016). Laminin: loss-of-function studies *Cell Mol Life Sci.* 1. [Epub ahead of print].
- Yu, F., Iyer, D., Anaya, C. e Lewis, J. (2006). Identification and characterization of a cell surface protein of *Prevotella intermedia* 17 with broad-spectrum binding activity for extracellular matrix proteins. *Proteomics*, 6, 6023-6030.
- Yu, C.C., Lin, C.J., Hwang, J.K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science* 13:1402-1406
- Yurchenco, P.D. e Furthmayr, H. (1984). Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry.* 10;23(8):1839-50.
- Yurchenco, P.D. e Ruben, G.C. (1987). Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol.* 105 (6 Pt 1):2559-68.
- Yurchenco, P. D. e Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4, 1577–1590.
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004911.
- Zhang, L. (2010). Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Eds (Academic Press), volume 93, Pp 17-18.

Tabela 4: Proteínas de *Prevotella nigrescens* identificadas a partir das bandas cortadas do gel contendo eluição com glicina-HCl.

Número	Possível localização ¹	Número de Acesso ²	Identificação	Score ³	Massa (DA) ⁴	Peptídeos Representativos	Banda
1	MI	WP_004362639.1	NfeD family protein [Prevotella nigrescens]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
2	CT	WP_004364227.1	MULTISPECIES: ABC-F family ATPase [Prevotella]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
3	CT	WP_004365944.1	N-acetylneuraminate synthase [Prevotella nigrescens]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
4	CT	WP_004365444.1	formate--tetrahydrofolate ligase [Prevotella nigrescens]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
5	PE	WP_004365796.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	79	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	C1
6	ME	WP_004365492.1	DNA mismatch repair protein MutL [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
7	CT	WP_081470680.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1

8	CT	WP_004362089.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
9	CT	WP_004367404.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
10	ME	WP_004366532.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
11	CT	WP_004362466.1	glutamate--tRNA ligase [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
12	CT	WP_004367044.1	non-canonical purine NTP diphosphatase [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
13	CT	WP_004366094.1	glycosyl transferase [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
14	CT	WP_004365442.1	trigger factor [Prevotella nigrescens]	65	1032.5087	LTLEGEESR	C1
15	CT	WP_004365773.1	molecular chaperone DnaJ [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
16	CT/EC/ MF	WP_004365955.1	dehydrogenase [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1

17	CT	WP_004365997.1	GTPase HflX [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
18	CT	WP_004364449.1	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit gamma [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
19	CT	WP_004366011.1	glycine dehydrogenase (aminomethyl-transferring) [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
20	PE	WP_004367532.1	DNA-binding protein [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
21	CT	WP_004367305.1	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
22	MI	WP_004366859.1	TonB-dependent receptor [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
23	EC	WP_004366499.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1
24	CT	WP_004365849.1	phosphoribosylformylglycin amidine cyclo-ligase [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	C1

25	EC	WP_004366403.1	right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
26	PE/EC/MF	WP_004366639.1	secretion protein [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
27	MI	WP_004367464.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
28	CT	WP_004364138.1	DNA mismatch repair protein MutL [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
29	CT	WP_004365444.1	formate--tetrahydrofolate ligase [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
30	PE/CT	WP_004367678.1	pyruvate:ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase [Prevotella nigrescens]	65	1231.5906	SGGGGGGLGSGGS	C1
31	MI	WP_004365652.1	peptide transporter [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
32	ME	WP_004367449.1	clan AA aspartic protease [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1

33	PE	WP_004367397.1	S46 family peptidase [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
34	ME/MI	WP_004367074.1	protein translocase subunit SecDF [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
35	ME/MI	WP_004366460.1	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6- hydroxy-3-cyclohexene-1- carboxylic-acid synthase [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
36	MI	WP_004366974.1	potassium transporter [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
37	CT/EC	EGQ11699.1	hypothetical protein HMPREF9419_2315 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
38	MI	WP_004364883.1	ZIP family metal transporter [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
39	MI	WP_004365666.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
40	CT	WP_040557068.1	tRNA uridine-5- carboxymethylaminomethyl (34) synthesis enzyme MnmG [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1

41	CT	EGQ13699.1	glucose inhibited division protein A [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
42	ME	WP_004366425.1	LPS-assembly protein LptD [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
43	ME	WP_004367324.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	63	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	C1
44	CT	WP_004363232.1	ribosome assembly cofactor RimP [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
45	CT	WP_004366795.1	arginine--tRNA ligase [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
46	ME	WP_004366647.1	TonB-dependent receptor [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
47	CT	WP_040556913.1	RNA polymerase sigma-54 factor [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
48	CT	EGQ14011.1	DNA-directed RNA polymerase sigma subunit RpoN [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
49	PE/ME	WP_004366250.1	tetratricopeptide repeat protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1

50	CT	WP_004365598.1	4-alpha-glucanotransferase [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
51	ME	EGQ16905.1	hypothetical protein HMPREF9419_0604 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
52	ME	WP_040556769.1	DUF3078 domain- containing protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
53	ME/PE/ CT	WP_004367829.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
54	CT	EGQ14997.1	hypothetical protein HMPREF9419_1168 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
55	PE	WP_004363552.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	C1
56	CT	WP_040557317.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	61	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	C1
57	CT	EGQ11879.1	SNF2/RAD54 family helicase [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	61	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	C1
58	CT	WP_004366616.1	DNA methylase [Prevotella nigrescens]	61	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	C1

59	CT	WP_004365773.1	molecular chaperone DnaJ [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
60	CT/EC/ME	WP_004365955.1	dehydrogenase [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
61	CT	WP_004364449.1	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit gamma [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
62	MI	WP_004366859.1	TonB-dependent receptor [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
63	EC	WP_004366403.1	right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
64	MI	WP_004367464.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
65	CT	WP_004365444.1	formate--tetrahydrofolate ligase [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
66	PE/CT	WP_004367678.1	pyruvate:ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2

67	CT	WP_004365997.1	GTPase HflX [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
68	PE	WP_004367532.1	DNA-binding protein [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
69	PE/EC/ ME	WP_004366639.1	secretion protein [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
70	CT	WP_004364138.1	DNA mismatch repair protein MutL [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
71	CT	WP_004366011.1	glycine dehydrogenase (aminomethyl-transferring) [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
72	CT/MI	WP_004367305.1	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
73	EC	WP_004366499.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2
74	CT	WP_004365849.1	phosphoribosylformylglycin amidine cyclo-ligase [Prevotella nigrescens]	64	1231.5906	SGGGGGGGLGSGGS	D2

75	PE	WP_004363552.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
76	ME	WP_004366647.1	TonB-dependent receptor [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
77	CT	WP_004363232.1	ribosome assembly cofactor RimP [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
78	CT	WP_004366795.1	arginine--tRNA ligase [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
79	CT	WP_040556913.1	RNA polymerase sigma-54 factor [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
80	CT	EGQ14011.1	DNA-directed RNA polymerase sigma subunit RpoN [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
81	PE/ME	WP_004366250.1	tetratricopeptide repeat protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
82	CT	WP_004365598.1	4-alpha-glucanotransferase [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
83	ME	EGQ16905.1	hypothetical protein HMPREF9419_0604 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2

84	ME	WP_040556769.1	DUF3078 domain-containing protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
85	ME/PE/ CT	WP_004367829.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
86	CT	EGQ14997.1	hypothetical protein HMPREF9419_1168 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	62	1380.6408	ALEESNYELEGK	D2
87	CT	WP_004367404.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
88	CT	WP_004362466.1	glutamate--tRNA ligase [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
89	ME/EC/ PF	WP_004365461.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
90	ME/CT	WP_004365492.1	DNA mismatch repair protein MutL [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
91	CT	WP_081470680.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
92	CT	WP_004362089.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
93	CT	WP_004367044.1	non-canonical purine NTP diphosphatase [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2

94	ME/EC/ PF	WP_004366532.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
95	CT	WP_004366094.1	glycosyl transferase [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
96	CT	WP_004365442.1	trigger factor [Prevotella nigrescens]	60	1032.5087	LTLEGEESR	D2
97	PE	WP_004365796.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
98	CT	WP_004364227.1	MULTISPECIES: ABC-F family ATPase [Prevotella]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
99	MI	WP_004362639.1	NfeD family protein [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
100	CT	WP_004365444.1	formate--tetrahydrofolate ligase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
101	CT	WP_004365944.1	N-acetylneuraminate synthase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E1
102	CT	WP_004366616.1	DNA methylase [Prevotella nigrescens]	63	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E1

103	CT	EGQ11879.1	SNF2/RAD54 family helicase [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	63	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E1
104	CT	WP_040557317.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	63	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E1
105	ME	WP_004366425.1	LPS-assembly protein LptD [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
106	MI	EGQ13699.1	glucose inhibited division protein A [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
107	CT	WP_040557068.1	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl (34) synthesis enzyme MnmG [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
108	CT/EC	EGQ11699.1	hypothetical protein HMPREF9419_2315 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
109	CT/EC	WP_004366974.1	potassium transporter [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1

110	PE	WP_004367397.1	S46 family peptidase [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
111	ME	WP_004367324.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
112	MI	WP_004365666.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
113	ME/MI	WP_004366460.1	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic-acid synthase [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
114	ME/MI	WP_004367074.1	protein translocase subunit SecDF [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
115	ME	WP_004367449.1	clan AA aspartic protease [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
116	MI	WP_004364883.1	ZIP family metal transporter [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
117	MI	WP_004365652.1	peptide transporter [Prevotella nigrescens]	61	1253.6001	GFSSGSVVSGGSR	E1
118	ME/CT/FC	WP_004366862.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1

119	ME/EC	WP_004365577.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
120	ME	EGQ16011.1	hypothetical protein HMPREF9419_0748 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
121	ME	WP_040556793.1	TonB-dependent receptor [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
122	CT	WP_004366222.1	ABC transporter ATP-binding protein [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
123	PE	WP_004367822.1	peptidase C10 [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
124	MI/CT	WP_040557220.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
125	CT	EGQ12198.1	hypothetical protein HMPREF9419_2077 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
126	CT	WP_004365873.1	glutathione peroxidase [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
127	MI	WP_004367156.1	CPBP family intramembrane metalloprotease [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1

128	CT	WP_004367337.1	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
129	PE	WP_004365735.1	peptidylprolyl isomerase [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
130	CT	WP_004365478.1	chromosome partitioning protein ParB [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
131	CT	WP_004366365.1	DNA gyrase subunit A [Prevotella nigrescens]	61	1178.5931	YEELQITAGR	E1
132	CT	WP_004366616.1	DNA methylase [Prevotella nigrescens]	78	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E2
133	CT	EGQ11879.1	SNF2/RAD54 family helicase [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	78	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E2
134	CT	WP_040557317.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	78	1474.7780	FLEQQNQVLQTK	E2
135	PE	WP_004367532.1	DNA-binding protein [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
136	CT	WP_004367238.1	phosphoribosylformylglycinamide synthase [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2

137	CT	WP_004367092.1	glycine C- acetyltransferase [Prevotella]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
138	ME	WP_004366003.1	MxhH protein [Prevotella]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
139	CT	WP_040556981.1	AraC family transcriptional regulator [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
140	ME/PE/ CT	WP_004367829.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
141	CT	WP_004365708.1	RelA/SpoT family protein [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
142	ME/EC/ PE/CT	WP_004366627.1	zinc-ribbon domain- containing protein [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
143	MI	WP_004366520.1	sulfatase [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
144	CT	WP_004367814.1	acyl dehydratase [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2
145	CT	WP_004366933.1	redox-regulated ATPase YchF [Prevotella nigrescens]	72	1063.6026	LASYIDKVR	E2

146	MI	WP_004367058.1	calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
147	EC/ME	WP_004367081.1	RagB/SusD family nutrient uptake outer membrane protein [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
148	ME	WP_004362983.1	RagB/SusD family nutrient uptake outer membrane protein [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
149	ME	WP_040556908.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
150	ME	EGQ14502.1	hypothetical protein HMPREF9419_1382 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
151	MI	WP_004365642.1	hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
152	ME	WP_004367120.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2

153	PE/CT	WP_004366087.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	72	1266.6568	LNIDQNPGTAPK	E2
154	PE	WP_004365796.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
155	CT	WP_004364227.1	MULTISPECIES: ABC-F family ATPase [Prevotella]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
156	MI	WP_004362639.1	NfeD family protein [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
157	CT	WP_004362639.1	NfeD family protein [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
158	CT	WP_004365944.1	N-acetylneuraminate synthase [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
159	CT	WP_004365944.1	N-acetylneuraminate synthase [Prevotella nigrescens]	70	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E2
160	CT/PE	WP_004365567.1	penicillin-binding protein 2 [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
161	ME	WP_004366501.1	cell surface protein SprA [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3

162	CT	WP_004366883.1	RluA family pseudouridine synthase [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
163	PE/CT/MI	WP_004365914.1	peptidase S41 [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
164	CT	WP_004367087.1	IS4 family transposase [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
165	CT	WP_004366708.1	riboflavin biosynthesis protein RibD [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
166	CT	WP_004367721.1	CRISPR-associated protein Csn1 [Prevotella nigrescens]	69	1715.8438	QISNLQQSISDAEQR	E3
167	CT	WP_004365944.1	N-acetylneuraminate synthase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
168	CT	WP_004365444.1	formate-- tetrahydrofolate ligase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
169	MI	WP_004362639.1	NfeD family protein [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
170	CT	WP_004364227.1	MULTISPECIES: ABC-F family ATPase [Prevotella]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3

171	PE	WP_004365796.1	ATP-dependent helicase [Prevotella nigrescens]	69	1301.7078	SLDLDSIIAEVK	E3
172	CT	WP_004366094.1	glycosyl transferase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
173	CT	WP_004367092.1	glycine C- acetyltransferase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
174	CT	WP_004366775.1	LicD family protein [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
175	MI/CT	WP_023924777.1	HlyC/CorC family transporter [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
176	ME/PE/ CT	WP_004367829.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
177	CT	WP_004367332.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
178	ME/EC/ PE/CT	WP_004366627.1	zinc-ribbon domain- containing protein [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
179	ME	WP_004366138.1	DUF4738 domain- containing protein [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3

180	MI	WP_004366520.1	sulfatase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
181	CT	WP_004367339.1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
182	CT	WP_004367155.1	bifunctional riboflavin kinase/FAD synthetase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
183	CT	WP_004363594.1	D-alanine--D-alanine ligase [Prevotella nigrescens]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
184	CT	EGQ11880.1	hypothetical protein HMPREF9419_2118 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
185	CT	EGQ11880.1	hypothetical protein HMPREF9419_2118 [Prevotella nigrescens ATCC 33563]	65	1081.5920	FASFIDKVR	E3
186	EC/PE	WP_004367554.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	64	1638.8366	SLNDQFASFIDKVR	E3

187	MI	WP_004367359.1	hypothetical protein [Prevotella nigrescens]	64	1638.8366	SLNDQFASFIDKVR	E3
188	CT	WP_004367859.1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit [Prevotella nigrescens]	64	1638.8366	SLNDQFASFIDKVR	E3
189	ME/PE/ CT	WP_004367829.1	membrane protein [Prevotella nigrescens]	64	1638.8366	SLNDQFASFIDKVR	E3

Tabela 5: Proteínas de *Prevotella nigrescens* identificadas a partir da digestão *in solution* da eluição com glicina-HCl.

Número	Possível localização ¹	Número de Acesso ²	Identificação	Score ³	Massa (DA) ⁴	Peptídeos Representativos
1	PE	WP_004363738.1	L-asparaginase 2 [Prevotella nigrescens]	51	2027.0899	LPNITILATGGTIAGGGDSATK
2	CT	WP_004367307.1	cell division protein FtsZ [Prevotella nigrescens]	51	2027.0899	LPNITILATGGTIAGGGDSATK
3	EC/ME	WP_004366636.1	T9SS C-terminal target domain-containing protein (Prevotella nigrescens)	51	2027.0899	LPNITILATGGTIAGGGDSATK
4	ME	WP_004366564.1	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Prevotella nigrescens]	51	2027.0899	LPNITILATGGTIAGGGDSATK
5	PE	WP_004363738.1	L-asparaginase 2 [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG
6	CT	WP_004365977.1	NAD-utilizing dehydrogenase [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG

7	CT	WP_004365488.1	IMP dehydrogenase [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG
8	ME	WP_004367002.1	AraC family transcriptional regulator [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG
9	PE	WP_004367822.1	peptidase C10 [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG
10	CT	WP_004367484.1	ABC transporter ATP- binding protein [Prevotella nigrescens]	28	2153.0641	ALVDAGYDGIVSAG

